



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

**Studies on Synthesis and Characterization  
of Highly Fluorescent Water-Soluble Turn-  
on Diarylethene for Bio-imaging**

바이오이미징을 위한 수용성 고휘광성 디아릴에텐의  
합성과 특성에 관한 연구

2017년 2월

서울대학교 대학원

재료공학부

엄 상 훈



# **Studies on Synthesis and Characterization of Highly Fluorescent Water-Soluble Turn- on Diarylethene for Bio-imaging**

바이오이미징을 위한 수용성 고휘광성 디아릴에텐의  
합성과 특성에 관한 연구

지도 교수 박 수 영

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함  
2017 년 2 월

서울대학교 대학원  
재료공학부 재료공학전공  
엄 상 훈

엄상훈의 석사 학위논문을 인준함  
2017 년 2 월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 장 지 영 (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ 박 수 영 (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 안 철 희 (인)

# **Studies on Synthesis and Characterization of Highly Fluorescent Water-Soluble Turn- on Diarylethene for Bio-imaging**

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUESTMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER  
IN ENGINEERING AT THE GRADUATE SCHOOL OF  
SEOUL NATIONAL UNIVERSITY

FEBURARY 2017

By

**Sang Hoon Um**

Supervisor

**Prof. Soo Young Park**

## 초 록

### 바이오이미징을 위한 수용성 고휘광성 디아릴에텐의 합성과 특성에 관한 연구

서울대학교 대학원

재료공학부

엄 상 훈

자극반응물질들은 바이오센서, 약물전달, 스마트 광학시스템 등의 다양한 분야에서 중요성이 증가함에 따라 함께 주목 받고 있다. 그 중 빛은 가장 우수한 자극으로 꼽힌다. 그 이유는 접근성, 빠른 반응성, 물리적접촉이 없다는 점, 좁은 지역에 초점을 맞추기 쉽다는 점 때문이다. 이러한 장점들은 생체 내 세포의 구조 및 움직임을 파악하고 추적하는데 유리하며, 더욱이나 초고해상도 현미경의 등장으로 인해 바이오 이미징에서 광변색성 물질을 사용한 연구가 급증하고 있다. 이는 기존의 형광체들과 다르게 형광을 켜고, 끄는 방법을 이용한다면, 형광체의 형광을 세포의 자가형광과 구별하여 높은 명암비를 가진 이미지를 얻을 수 있기 때문이다. 다양한 광변색성 물질군 중 디아릴에텐은 가장 우수한 피로안정성과 열적 안정성을 가진다. 또한 빛자극에 의한 정반응은 빠르고, 역반응은 느려서 빛에 의해 정보를 빠르게 읽어 드리며, 정보를 읽는 동안 상태가 안정적이게 유지 될수 있다는 장점이 있다. 하지만 기존의 디아릴에텐은 형광체와 연결하거나 섞어서 에너지 전달을 이용한 형광이 꺼지는 시스템에 이용 되어 왔다.

이는 형광이 켜지는 시스템에 비해 낮은 명암 비를 가진다는 단점을 가진다. 이러한 문제가 형광이 켜지는 디아릴에텐이 발표되고 해결되었지만, 물에 녹이기 힘들다는 단점으로 인해 여전히 한계점을 가지고 있다. 이러한 불 수용성 단점을 해결하기 위해 나노입자를 이용하여 왔지만, 나노입자는 오스트발트 숙성 현상에 의해 입자가 뭉치게 되고 생체내에서 독성을 가질수 있게 된다. 이외에도 분자단위로 이미지를 얻을 수 없다는 점과 단분자와 다르게 상대적으로 큰 크기와 무게로 보다 작은 세포의 움직임을 추적하기 어렵다는 단점이 있다. 이러한 원인 들로 인해 수용성 디아릴에텐의 개발이 요구 되고 있다.

형광이 꺼지는 디아릴에텐의 연구를 바탕으로 형광이 켜지는 수용성 디아릴에텐을 만들기 위해 단당류와 카르복실산을 이용한 예가 보고 되었지만, 순수한 물에 녹지 않는다는 점 및 상대적으로 높은 pKa 값으로 인해 좁은 pH 범위에서의 제한된 활용성을 가진다는 단점을 가지고 있다. 이를 해결한다면 단분자로서 이상적인 바이오이미징 형광체 일 뿐 아니라 나아가 앞으로 회절한계인 200 nm를 넘어선 고해상도 현미경을 통한 분야에서도 큰 가능성을 볼 수 있을 것으로 예상된다.

**Chapter 2**에서는 수용성 디아릴에텐을 설계하고 합성하였다. 새롭게 합성한 수용성 디아릴에텐은 기존에 보고된 수용성 디아릴에텐과 다르게 넓은 범위의 pH 값을 가지고 물에 대한 용해도가 높다는 것을 알수 있다. 또한 높은 흡수계수와 발광 수율, 높은 피로저항성, 빠른 고리화 반응과 느린 고리화의 역반응으로 높은 명암 비의 이미지를 안정적으로 얻을 수 있다. 이를 통해 우수한 광변색성 물질로서 세포 내에서의 활용가능성을 파악 하였다.

**Chapter 3**에서는 Hela 세포를 배양한 후 수용성 디아릴에텐을 Hela 세포 내에 흡수 시켰다. 공초점 현미경으로 새롭게 합성한 광변색성

물질이 세포내에 흡수되고, 형광이 안정적으로 꺼졌다 켜지는 것을 확인하였다. 이 물질이 초고해상도 현미경에서 작동하는지 Hela 세포 내에서 pump-probe 실험을 진행 하였다. 실제로 초고해상도 현미경에 사용하기 위해선 라벨링을 해야 한다. 이를 위해 양전하를 가진 나노입자에 전기적으로 광변색 물질을 붙였다. 공초점 현미경으로 확인한 결과 전기적 결합이 유효한 것을 확인하였고, 앞으로 바이오 이미징 및 초고해상도 이미지에 기대되는 물질이라는 것을 알 수 있었다.

**주요어:** 수용성, 광변색성, 디아릴에텐, 바이오이미징, 턴온(turn-on) 형광, 초고해상도 현미경

**학 번:** 2015-20842



# Contents

<b>Abstract</b> .....	i
<b>Contents</b> .....	iv
<b>List of Abbreviations</b> .....	vi
<b>List of Tables</b> .....	vii
<b>List of Schemes</b> .....	viii
<b>List of Figures</b> .....	ix

## **Chapter 1 서론**.....1

1.1 광변색성 원리 .....	1
1.2 디아릴에텐 .....	4
1.3 수용성 디아릴에텐 .....	10
1.4 바이오 응용 기술분야 .....	13
1.5 연구목표 .....	16
1.6 참고문헌 .....	19

## **Chapter 2 수용성 고휘광 디아릴에텐의 특성평가**....24

2.1 도입 .....	24
2.2 실험 .....	28
2.3 결과 및 논의 .....	40
2.4 결론 .....	68
2.5 참고문헌 .....	69

## **Chapter 3 바이오 이미징을 위한 수용성 고휘광 디아릴에 텐의 응용 71**

3.1	서론.....	71
3.2	실험.....	75
3.3	결과 및 논의 .....	80
3.4	결론.....	98
3.5	참고문헌.....	99

## **Abstract in English..... 103**

## List of Abbreviations

GFP	green fluorescent protein	녹색형광단백질
DCM	dichloromethane	
DFT	density functional theory	밀도 범함수 이론
PLQY	photoluminescence quantum yield	발광수율
rPLQY	relative photoluminescence quantum yield	상대적발광수율
THF	tetrahydrofuran	
TLC	thin layer chromatography	박층 크로마토그래피
STED	Stimulated emission depletion	
PSS	Photostationary state	광평형상태

## List of Tables

<b>Table 2.1</b>	SO3-BPDBTEO의 DFT 계산 결과.....	44
<b>Table 2.2</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 메탄올에서의 광물리적 특성. 열린이성지체의 흡광 파장, 단힌 이성질체의 흡광 파장, 발광 파장, 상대적 발광 수율. 등흡수점. ....	50
<b>Table 2.3</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 메탄올에서의 광물리적 특성. 단힌 형태의 상대적 발광수율, 형광 수명 시간, 무방사 및 방사 속도상수.....	50
<b>Table 2.4</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 메탄올에서의 Photocyclization 특성. (참고물질인 BPDBTEO의 알려진 0.42의 값과 기울기비를 통하여 구한다.)......	58
<b>Table 2.5</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 메탄올에서의 Photocycloreversion 특성. (참고물질인 BPDBTEO의 알려진 $4.0 \times 10^{-4}$ 의 값과 기울기비를 통하여 구한다.).58	
<b>Table 2.6</b>	SO3-BPDBTEO를 MeOD : D2O의 비율을 변화 시켜 가며, $^1\text{H-NMR}$ 에서 얻은 각각의 적분비. 적분비를 통하여 ap : p 비를 구한 결과.....	63

## List of Schemes

<b>Scheme 2.1</b>	SO <sub>3</sub> -BPDBTEO의 합성 과정.....	36
<b>Scheme 2.2</b>	BPDBTEO의 합성 과정 .....	36

## List of Figures

<b>Figure 1.1</b>	광변색성물질의 두가지 이성질체.....	3
<b>Figure 1.2</b>	광변색 물질의 4가지 에너지 준위와 에너지 장벽 .....	3
<b>Figure 1.3</b>	광변색성 물질이 가지는 등흡수점 <sup>5</sup> .....	3
<b>Figure 1.4</b>	다양한 광변색성 물질군 (a)Cy3, (b)Alexa, (c)GFP, (d)spiropyran, (e)Flugide, (f) Turn-off diarylethene, (g) Turn-on diarylethene. ....	7
<b>Figure 1.5</b>	초기 디아릴에텐의 모식도. ....	8
<b>Figure 1.6</b>	1.3.5-hexatriene의 고리화 반응 및 그 역반응. ....	8
<b>Figure 1.7</b>	(a)4각형 고리, (b) 5각형 고리, (c)6각형 고리 디아릴에텐의 모식도.....	8
<b>Figure 1.8</b>	디아릴 에텐의 역평행 구조와 평행구조의 모식도. ....	9
<b>Figure 1.9</b>	에너지 전달을 이용한 디아릴에텐의 형광을 끄는 모식도. (a)이분자, (b)혼합물.....	9
<b>Figure 1.10</b>	형광을 켜는 디아릴에텐의 모식도.....	9
<b>Figure 1.11</b>	형광이 켜지는 디아릴에텐에 단당류를 붙인 수용성 광변색 물질.....	12
<b>Figure 1.12</b>	형광이 켜지는 디아릴에텐에 카르복실산을 붙인 수용성 광변색 물질.....	12
<b>Figure 1.13</b>	기존의 공초점 현미경의 회절한계를 초고해상도 현미경을 통하여 극복한 이미지.....	14
<b>Figure 1.14</b>	회절한계인 200 nm와 세포들의 크기. (회절한계인 200 nm는 mitochondria와 유사. <sup>14</sup> .....	15
<b>Figure 1.15</b>	새로 디자인한 술폰선염이 달린 형광이 켜지는 디아릴에텐	

	(SO3-BPDBTEO).....	18
<b>Figure 2.1</b>	형광이 켜지는 디아릴에텐에 단당류를 붙인 수용성 광변색 .....	26
<b>Figure 2.2</b>	형광이 켜지는 디아릴에텐에 카르복실산을 붙인 수용성 광변색 물질.....	26
<b>Figure 2.3</b>	새로 디자인한 술폰선포이 달린 형광이 켜지는 디아릴에텐 (SO3-BPDBTEO).....	27
<b>Figure 2.4</b>	광변색 현상으로 인한 닫힌 형태의 흡수 변화(초반 직선 구간을 표기) (a) cyclization, (b) cycloreversion <sup>1d</sup> .....	30
<b>Figure 2.5</b>	SO3-BPDBTEO <b>MeOD</b> 용매에서, 300 MHz <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과.....	41
<b>Figure 2.6</b>	SO3-BPDBTEO <b>MeOD</b> 용매에서, 500 MHz <sup>13</sup> C-NMR을 찍은 결과.....	41
<b>Figure 2.7</b>	SO3-BPDBTEO <b>MeOD</b> 용매에서, 2D-NNMR(HSQC)을 찍은 결과.....	42
<b>Figure 2.8</b>	SO3-BPDBTEO 메탄올 용매에서, MALDI-TOF를 찍은 결과. ....	42
<b>Figure 2.9</b>	SO3-BPDBTEO의 HOMO/LUMO 전자 구름 분포. (a) LUMO의 전자구름 분포 (b)HOMO의 전자구름 분포.....	44
<b>Figure 2.10</b>	SO3-BPDBTEO <b>10<sup>-5</sup> M</b> 수용액의 흡광 및 발광 사진. (a) UV lamp 365 nm 광원 조사 전 열린형태의 형광, (b)UV lamp 365 nm 광원 조사 후 광평형 상태의 형광.( 형광은 Blue Led의 450 nm로 관측).....	47
<b>Figure 2.11</b>	SO3-BPDBTEO <b>10<sup>-5</sup> M</b> 수용액의 흡광 및 발광 스펙트럼 파랑선은 닫힌 이성질체, 하늘색선은 열린 이성질체의 스	

펙트럼 .....	47
<b>Figure 2.12</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 메탄올 용액의 흡광 및 발광 스펙트럼 빨강색선은 닫힌 이성질체, 핑크색선은 열린 이성질체의 스펙트럼.....	48
<b>Figure 2.13</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 메탄올에서의 흡광 및 발광 스펙트럼 비교. 파랑색선은 수용액, 빨강색은 메탄올 용액.....	48
<b>Figure 2.14</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 메탄올에서의 형광 수명 시간 비교. 빨강색은 메탄올 용액, 파랑색은 수용액..	49
<b>Figure 2.15</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 메탄올 용액과 BPDBTEO $10^{-5}$ M Dioxane 용액의 cyclization 실험. 각각의 결과를 linear fit 한 결과. ....	56
<b>Figure 2.16</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 BPDBTEO $10^{-5}$ M Dioxane 용액의 cyclization 실험. 각각의 결과를 linear fit 한 결과.....	56
<b>Figure 2.17</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 메탄올 용액과 BPDBTEO $10^{-5}$ M Dioxane 용액의 cycloreversion 실험. 각각의 결과를 linear fit한 결과. ....	57
<b>Figure 2.18</b> SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액과 BPDBTEO $10^{-5}$ M Dioxane 용액의 cycloreversion 실험. 각각의 결과를 linear fit 한 결과. ....	57
<b>Figure 2.19</b> SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=100:0 의 비율로 1H-NMR을 찍은 결과. 전체 이미지. ....	59
<b>Figure 2.20</b> SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=100:0 의 비율로 1H-NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지. ....	59



<b>Figure 2.21</b>	SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=70:30 의 비율로 <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과. 전체 이미지 .....	60
<b>Figure 2.22</b>	SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=70:30 의 비율로 <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지. ....	60
<b>Figure 2.23</b>	SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=50:50 의 비율로 <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과. 전체 이미지.. ....	61
<b>Figure 2.24</b>	SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=50:50 의 비율로 <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지.. ....	61
<b>Figure 2.25</b>	SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=30:70 의 비율로 <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과. 전체 이미지.. ....	62
<b>Figure 2.26</b>	SO3-BPDBTEO MeOD:D2O=30:70 의 비율로 <sup>1</sup> H-NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지. ....	62
<b>Figure 2.27</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액 상에서 얻은 50회 주기의 안정성 실험.. ....	65
<b>Figure 2.28</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액 상에서 얻은 20회 주기의 안정성 실험.. ....	65
<b>Figure 2.29</b>	SO3-BPDBTEO $10^{-5}$ M 수용액 상에서 KCl 100mmol 완충 용액을 이용하여 pH 3~ 10에서의 안정성 실험. ....	67
<b>Figure 3.1</b>	(a)형광이 꺼지는 디아릴에텐의 발광 스펙트럼, (b)형광이 켜지는 디아릴에텐의 발광 스펙트럼. ....	74
<b>Figure 3.2</b>	항체에 연결된 형광체가 항원/항체 반응으로 세포에 라벨링 되는 모식도. ....	74
<b>Figure 3.3</b>	항체에 연결하기 위한 2가지 방법. (a) 공유결합 (b) 전기적 결합.....	74
<b>Figure 3.4</b>	SO3-BPDBTEO을 흡수 하지 않은 Hela cell의 공초점 현미	

	경 사진.488nm 광원을 사용.(10배 대물렌즈 이미지). 81
<b>Figure 3.5</b>	SO3-BPDBTEO을 흡수 한 Hela cell의 공초점 현미경 사진. 488nm 광원을 사용.(10배 대물렌즈 이미지). ..... 82
<b>Figure 3.6</b>	SO3-BPDBTEO을 흡수 한 Hela cell의 공초점 현미경 사진. 488nm 광원을 사용.(63배 대물렌즈 이미지). ..... 83
<b>Figure 3.7</b>	SO3-BPDBTEO을 흡수 한 Hela cell의 공초점 현미경 사진으로 세포내에서의 광변색성 현상을 488nm 광원을 이용하여 형광으로 확인. (a)형광이 꺼진 초기 시작점, (b) 365nm 3분, (c) 458nm 5분, (d) 365nm 3분, (e) 458nm 5분, (f) 365nm 3분, (g) 458nm 5분, (h) 365nm 3분, (i) 458nm 5분.(63배 대물렌즈 이미지). ..... 87
<b>Figure 3.8</b>	SO3-BPDBTEO을 흡수 한 Hela cell에서 얻은 이미지에서 각각의 광자의 총량을 계산하여, 4회의 주기동안 안정적으로 형광이 나오는 것을 확인..... 88
<b>Figure 3.9</b>	Hela cell 내부의 SO3-BPDBTEO pump-probe 실험 결과. 375nm광원을 사용하여 형광을 켜는데 걸린시간 20us.. ..... 90
<b>Figure 3.10</b>	Hela cell 내부의 SO3-BPDBTEO pump-probe 실험 결과. 488nm광원을 사용하여 형광을 끄는데 걸린시간 40ms.. ..... 90
<b>Figure 3.11</b>	Hela cell 내부의 SO3-BPDBTEO pump-probe 실험 결과. 5회의 주기를 반복한 결과.. ..... 91
<b>Figure 3.12</b>	PS/F-127/PEI를 사용한 나노입자의 크기 분포 그래프. (314nm $\pm$ 97nm). ..... 93
<b>Figure 3.13</b>	상업적으로 구매한 SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> 나노입자의 크기 분포 그래

	프. ( $32.4\text{nm} \pm 12.9\text{nm}$ ). ....	93
<b>Figure 3.14</b>	PS/F-127/PEI를 사용한 나노입자의 공초점 현미경 이미지.(광원은 488nm를 사용). ....	96
<b>Figure 3.15</b>	상업적으로 구매한 SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> 나노입자의 공초점 현미경 이미지.(광원은 488nm를 사용) ....	96
<b>Figure 3.16</b>	PS/F-127/PEI를 사용한 나노입자의 공초점 현미경을 통한 입자 크기 계산 결과. 315nm의 크기 도출 (광원은 488nm를 사용). ....	97
<b>Figure 3.17</b>	상업적으로 구매한 SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> 나노입자의 공초점 현미경을 통한 입자 크기 계산 결과. 315nm의 크기 도출 (광원은 488nm를 사용). ....	97

# Chapter 1. 서론

## 1.1 광변색성 원리

자극반응물질들은 바이오센서, 약물전달, 스마트 광학시스템 등의 다양한 분야에서 중요성이 증가함에 따라 함께 주목 받고 있다. 그 중 빛은 가장 우수한 자극으로 꼽힌다.<sup>1</sup> 그 이유는 접근 성, 빠른 반응 성, 물리적 접촉이 없다는 점, 좁은 지역에 초점을 맞추기 쉽다는 점 때문이다.<sup>2</sup> 이러한 장점들은 생체 내 세포의 구조 및 움직임을 파악하고 추적하는데 유리하며, 더욱이나 초고해상도 현미경의 등장으로 인해 바이오 이미지 분야에서 광변색성 물질을 사용한 연구가 급증하고 있다.<sup>3</sup> 이러한 광변색성 물질은 빛을 이용하여 **Figure1.1** 과 같이 2가지의 열 적으로 안정한 이성질체를 가역적으로 변환할 수 있다. 이는 **Figure1.2** 와 같이 각각의 기저상태에서는 에너지 장벽이 높아서 이동할 수 없지만, 들뜬 상태에서는 에너지 장벽이 낮아서 빛 자극에 의해 가역적으로 이동할 수 있기 때문 이다. 이때 광변색성 현상이 일어나는 대표적인 예로는 전자고리화 반응 (pericyclic reaction), 시스-트랜스 이성질화 (cis-trans isomerizations), 분자 내 수소 전이 (intramolecular hydrogen transfer), 분자 내 원자단 이전 (intramolecular group transfer), 해리과정 (dissociation process)

과 산화환원과 같은 전자 이동 (electron transfer)이 있다.<sup>4</sup> 광변색성 현상을 이해하고 다양한 응용분야에 사용하기 위해서는 몇가지 중요한 특성이 있다. 이는 등흡수점 (isosbestic point), 광 평형상태 (photostationary state), 광변색성 수율 (photochromic quantum yield), 전환비율 (conversion ratio)과 내피로성 (fatigue resistance)이다.<sup>5</sup> 등흡수점 (isosbestic point)이란 2가지의 이성질체가 서로 평형을 이루고 있다는 뜻이며, **Figure1.3** 과 같이 2가지 이성질체의 흡수 스펙트럼이 한 점에서 교차하는 것을 통해 확인할 수 있다. 광평형 상태 (photostationary state)는 빛 자극에 의해 이성질체간의 평형이 이동되고, 최종상태에 도달한 것을 의미한다. 이론적으로 다른 이성질체로의 변화가 모두 가능하지만, 각각의 이성질체의 흡수 스펙트럼이 겹쳐 있는 경우가 많기 때문에, 일정한 빛 조건에서 연속 조사하면 그 파장에서의 이성질체의 흡수계수와 양자수율에 따라 광변색성반응은 평형에 도달하게 된다. 광변색성 수율 (photochromic quantumyield)와 전환 비율 (conversion ratio)의 경우는 이성질체 간의 변화가 얼마나 빨리 일어나며, 광평형상태로의 이성질체 변화가 얼마나 많이 일어났는지를 의미한다. 마지막으로 내피로성 (fatigue resistance)은 빛 자극에 의한 이성질체간의 반복적인 변화를 충분히 견딜 수 있는 성질을 의미한다.

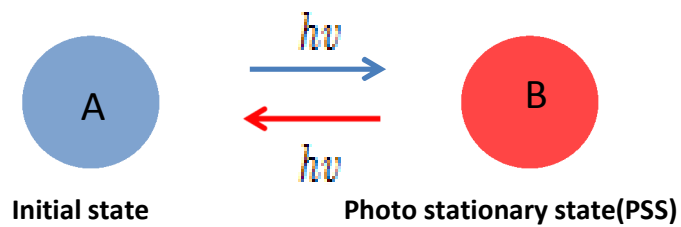


Figure 1.1 광변색성물질의 두 가지 이성질체

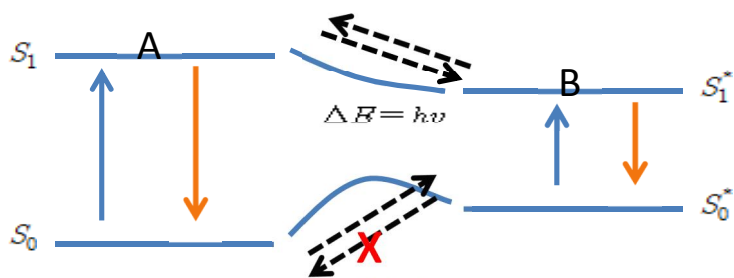


Figure 1.2 광변색 물질의 4 가지 에너지 준위와 에너지 장벽

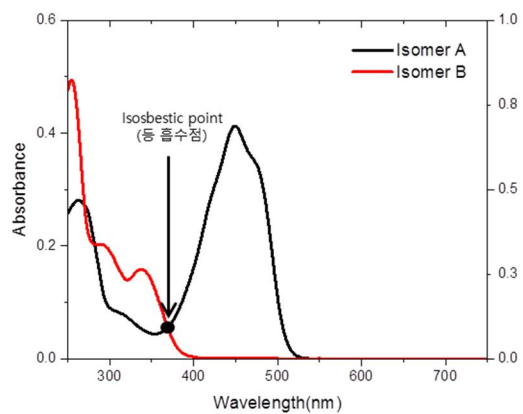


Figure 1.3 광변색성 물질이 가지는 등 흡수점<sup>5</sup>

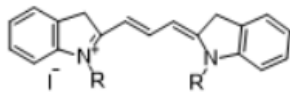
## 1.2 디아릴에텐

**Figure1.4** 와 같이 광변색성 물질은 크게 녹색형광단백질, 유기형광체, 합성 광변색성물질로 다양한 종류가 있다.<sup>6</sup> 하지만 유기형광체의 경우 이성질체로의 변화가 가역적이지 않거나, 안정성이 많이 떨어지고, 녹색형광단백질의 경우는 우수한 특성을 가졌지만, 크기가 커서 녹색형광단백질 보다 작은 세포의 움직임 및 구조를 보는 것에 한계점을 가지고 있다. 이러한 단점들을 해결하기 위해 합성 광변색성 물질들에 대한 연구가 활발히 진행 되고 있다. 그 대표적인 예로 스파이로피란과 디아릴에텐이 있다.<sup>6e,6f,6g,6h</sup> 그 중에서도 디아릴에텐의 경우 가장 열적 안정성 및 내피로성이 높아 약물전달, 바이오이미징, 스마트광학시스템 등과 관련하여 많은 연구가 진행 되고 있다. 이러한 디아릴에텐의 초기 디자인은 **Figure1.5** 와 같다.<sup>7</sup> 이 물질의 경우 빛에 의해 전자고리화 반응 (pericyclic reaction)이 일어난다. 들뜬 디아릴에텐이 빛에 의해 고리화 반응이 일어날때 **Figure1.6** 과 같이 가장 간단한 모형인 1,3,5-hexatriene 을 기초로 한 우드워드-호프만규칙 (Woodward Hoffman rules)을 따르게 된다. 총 6개의 전자가 참여하며, 동일방향 회전이 허용된다.<sup>8</sup> 하지만 이물질의 경우 시스-트랜스 이성질화 (cis-trans isomerization)에 의해 전자 고리화 반응 (pericyclic reaction)이 방해받게 되고, 빛에 의한 안정성이 낮다

는 단점이 있었다. 이를 해결하기 위해 이중 결합 부분을 고리화 시켜, **Figure1.7** 과 같이 다양한 유도체의 디아릴에텐을 개발하였다.<sup>9</sup> 이러한 디아릴에텐의 열린형태는 **Figure1.8** 과 같이 역평행구조와 평행구조가 있다. 각각의 고리화 반응이 일어나는 활성탄소의 p 궤도함수는 역평행구조에서만 동일방향 회전에 의한 고리화반응이 일어날수 있게 된다. 안정성이 향상된 디아릴에텐은 자체의 형광이 없어, 바이오이미징 및 바이오센서 및 스마트광학시스템 등에 이용하기 위해 **Figure1.9** 와 같이 형광체와 섞거나, 연결하여 이를 활용해왔다. 이러한 방법에는 에너지 전달을 이용하여 형광이 꺼지는 방법으로 **Figure1.10** 과 같이 형광이 꺼지는 방법에 비해 상대적으로 낮은 명암대비 값을 가지게 된다.<sup>10</sup> 이를 해결하고자 디아릴에텐의 개발은 계속 되었고, **Figure1.4(g)** 과 같이 기존의 디아릴에텐을 산화시켜, 형광이 꺼지는 디아릴에텐의 개발이 되었다.<sup>11</sup> 이 물질의 경우 높은 발광수율, 높은 전하비율, 높은 열적 안정성 및 내피로성, 빠른 고리화 반응과 느린 역반응으로 정보를 높은 명암대비로 정보를 빠르게 읽어 드릴 수 있으며, 정보를 읽는 동안 안정적으로 유지 될 수 있는 물질로 기존의 형광이 없는 디아릴에텐보다 우수한 광변색성 물질이다. 이러한 장점은 다양한 분야에서 요구하는 광변색성 물질의 특성에 부합하며, 그 중 바이오 이미징 및 초고해상도 현미경 분야에 가능성이 높은 물질군이다.

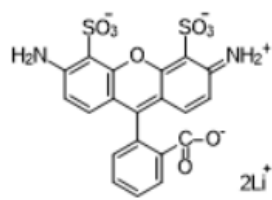


(a)



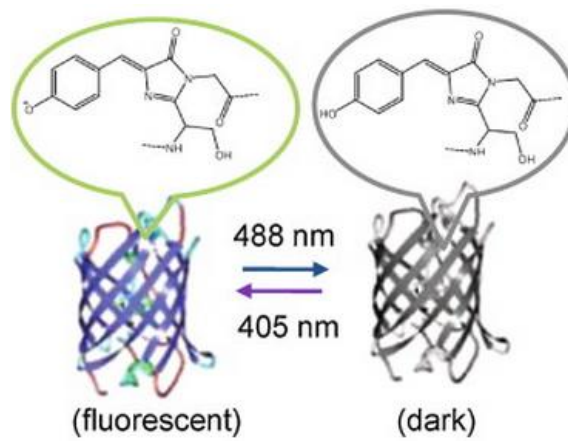
Cy3

(b)



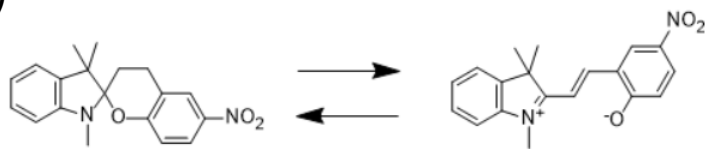
Alexa

(c)



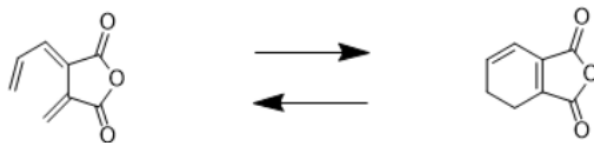
(d)

녹색형광단백질(GFP)



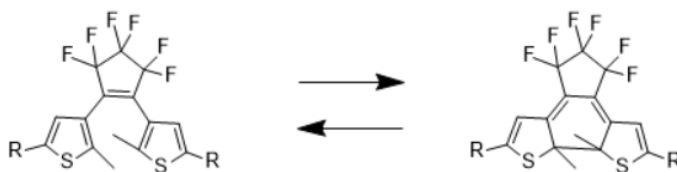
Spiropyran

(e)



Flugide

(f)



Turn-off Diarylethene

(g)



Turn-on Diarylethene

Figure 1.4 다양한 광변색성 물질 군 (a)Cy3, (b)Alexa, (c)GFP,  
(d)spiropyran, (e)Flugide, (f) Turn-off diarylethene, (g) Turn-on diarylethene

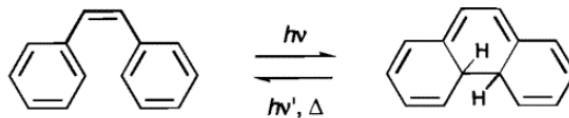


Figure1.5 초기 디아릴에텐의 모식도

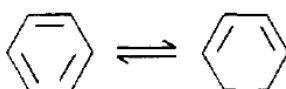


Figure1.6 1,3,5-hexatriene의 고리화 반응 및 그 역반응..

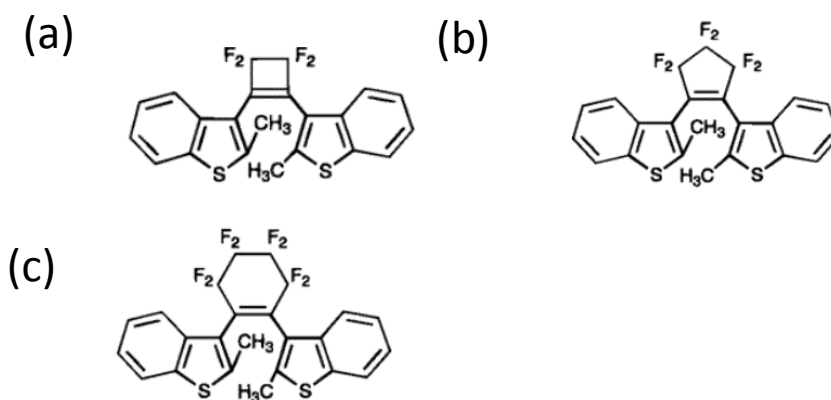


Figure1.7 (a)4각형 고리, (b) 5각형 고리, (c)6각형 고리 디아릴에텐의 모식도

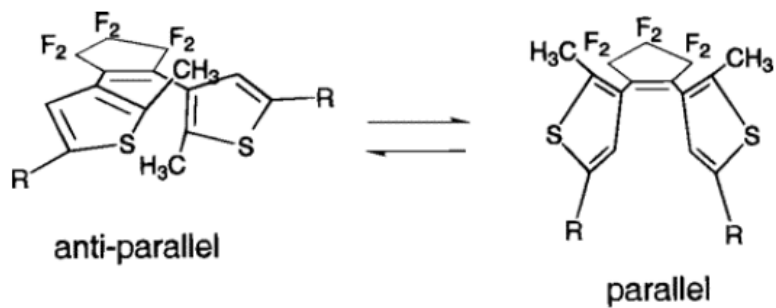


Figure 1.8 디아릴 에텐의 역평행 구조와 평행구조의 모식도.

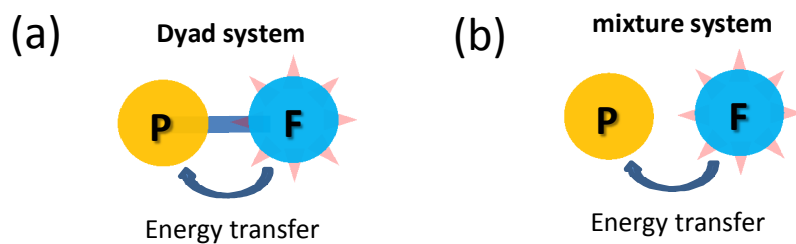


Figure 1.9 에너지를 전달을 이용한 디아릴에텐의 형광을 끄는 모식도. (a) 이분자, (b)혼합물



All in one system

Figure 1.10 형광을 켜는 디아릴에텐의 모식도

### 1.3 수용성 디아릴에텐

디아릴에텐의 경우 물리적 접촉이 없고, 초점을 맞추기 쉬운 빛자극을 이용할 뿐 아니라 높은 안정성을 가지고 있어서, 바이오 이미지 분야 및 초고해상도 현미경을 이용한 분야에서 활발히 연구가 진행되었다.<sup>2</sup> 이러한 디아릴에텐을 바이오 이미지 분야에 응용하기 위해 수용성 분자를 만들려고 하는 많은 연구가 진행 되어왔다.<sup>12</sup> 기존의 형광이 꺼지는 디아릴에텐의 경우 나노입자, 단당류, 이온성 작용기 등 다양한 방법을 이용하여 수용성 문제를 해결하였다. 하지만 최근 개발된 형광이 켜지는 디아릴에텐의 경우 우수한 특성을 가졌지만 상대적으로 연구가 많이 진행되지 않았고, 수용성 디아릴에텐의 예는 아주 적다.<sup>13</sup> 이를 해결하기 위해 기존의 방법을 이용하여 몇몇 연구결과가 발표되었다. 이들 중 나노입자는 오스트발트 숙성 현상에 의해 나노입자가 뭉치게 되고 생체 내에서 독성을 가질 수 있게 된다. 이외에도 분자단위로 이미지를 얻을 수 없다는 점과 단 분자와 다르게 상대적으로 큰 크기와 무게로 보다 작은 세포의 움직임을 추적하기 어렵다는 단점이 있다.<sup>14</sup> 이외에도 보고된 형광이 켜지는 수용성 디아릴에텐의 경우 **Figure1.11** 과 같이 단당류의 경우는 순수한 물에 녹지 않는다는 단점을 가지고 있다. 또한 **Figure1.12** 와 같이 카르복실산을 단 경우 물에대한 용해도가 높지 않을 뿐만 아니라 상대적으로 높은 pKa 값으

로 인해 좁은 pH 에서의 제한된 활용성을 가지고 있다. 이러한 단점들을 해결하고자 높은 수용성 특징을 가지고, 넓은 pH 범위를 가진 이온성 디아릴에텐의 개발이 필요로 된다.

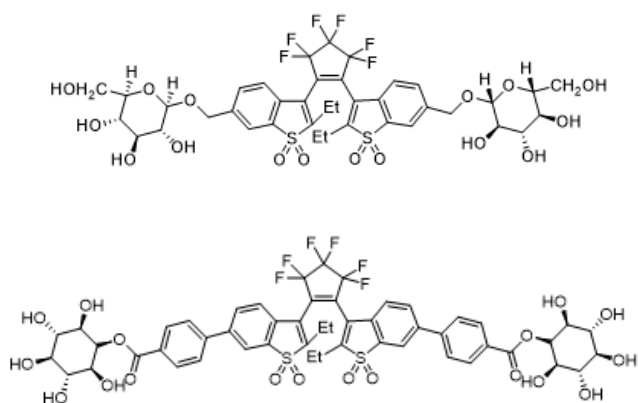


Figure 1.11 형광이 켜지는 디아릴에텐에 당당류를 붙인 수용성 광변색 물질

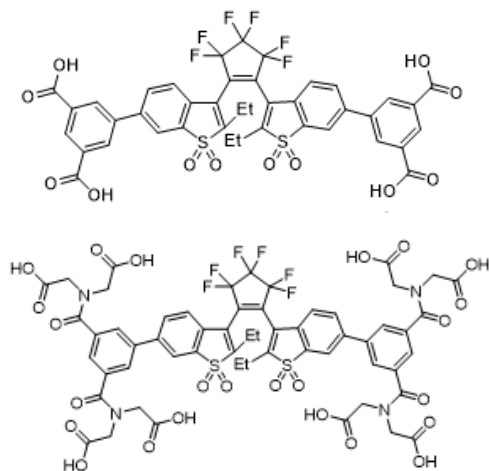


Figure 1.12 형광이 켜지는 디아릴에텐에 카르복실산을 붙인 수용성 광변색 물질

## 1.4 바이오 응용 기술 분야

높은 발광수율, 높은 전환 비율, 빠른 고리화 반응 및 느린 역반응, 높은 안정성 및 내피로성 등의 우수한 특성을 가진 형광이 켜지는 디아릴에텐을 생체분야에 활용하고자 한다. 이러한 형광이 켜지는 디아릴에텐의 경우 특히 바이오이미징 분야에서의 활용도가 높다. 첫번째로는 세포의 자가형광을 제거한 높은 명암대비 이미지를 얻을 수 있다는 것이다. 세포의 자가형광은 형광체와의 명암대비를 저해 시키고 낮은 해상도의 이미지를 얻게 한다. 이러한 자가형광을 제거하고 높은 명암대비의 이미지를 얻기 위해선 비율적도 이미징, 시간분해 이미징, 광변색성 이미지 방법이 이용가능하다.<sup>15</sup> 이중 높은 명암대비를 가진 형광이 켜지는 디아릴에텐의 경우 광변색성 이미지 방법에 응용가능하며, 높은 명암대비의 세포 이미지를 얻을 수 있게 된다. 두번째는 초고해상도 현미경에 응용 가능하다는 것이다. **Figure1.13** 와 같이 초고해상도 현미경은 회절한계인 200 nm 극복하여, **Figure1.14** 와 같이 미토콘드리아 보다 작은 세포 의 움직임 및 구조를 파악할 수 있는 장비이며, 이때 형광이 켜지는 광변색성 물질이 사용되기 때문이다.<sup>16</sup>



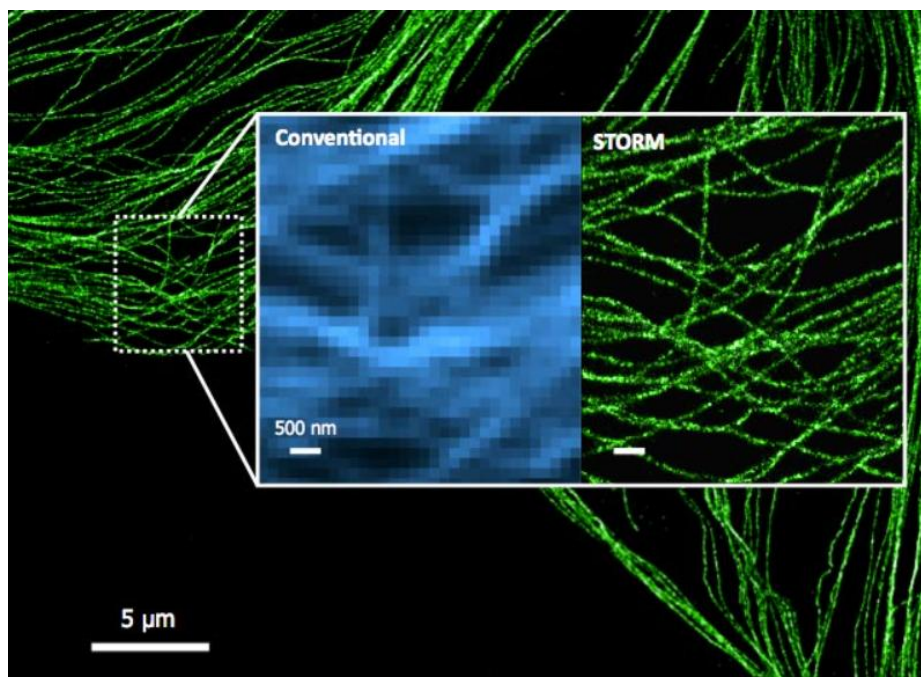


Figure 1.13 기존의 공초점 현미경의 회절한계를 초고해상도 현미경을 통하여 극복한 이미지.

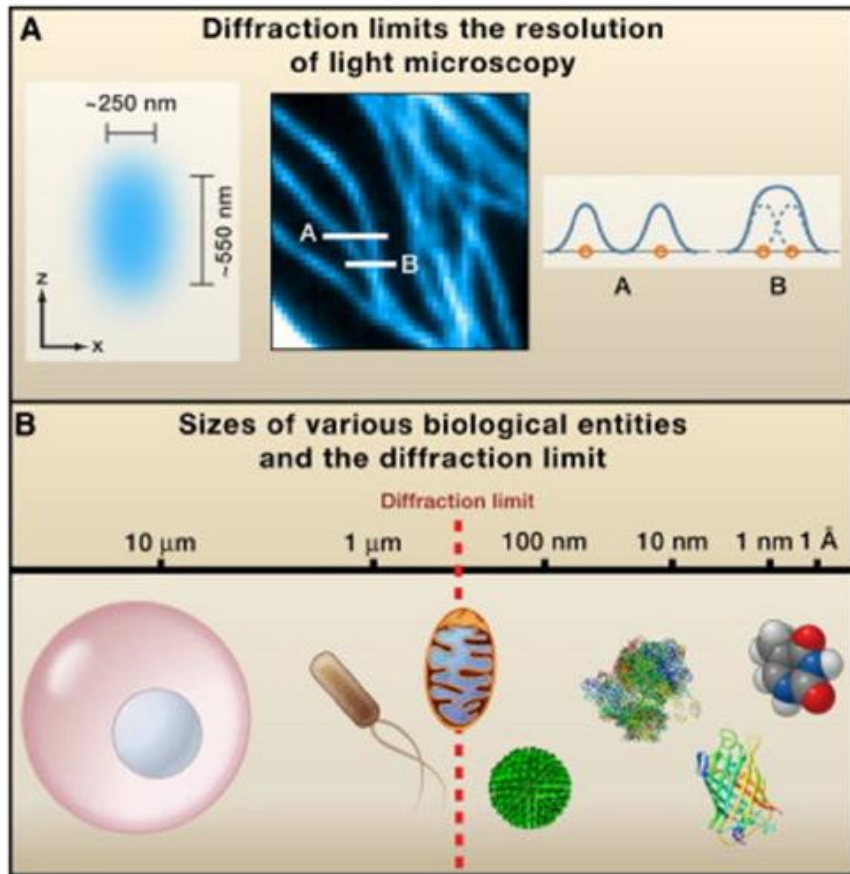


Figure 1.14 회절한계인 200 nm 와 세포들의 크기. (회절한계인 200 nm 는 mitochondria 와 유사).<sup>15</sup>

## 1.5 연구목표

최근 개발된 형광이 켜지는 디아릴에텐의 경우 높은 흡수계수, 높은 발광수율, 높은 전환 비율, 빠른 고리화 반응 및 느린 역 반응, 높은 안정성 및 내피로성 등의 우수한 특성을 가져 바이오 이미지 분야 및 초고해상도 현미경을 이용한 분야에서 많은 연구가 진행 되었다.<sup>2</sup> 형광이 켜지는 디아릴에텐을 바이오 이미지 분야에서 응용하기 위해 형광이 꺼지는 디아릴에텐의 연구를 바탕으로<sup>12</sup>, 수용성 분자를 만들고자 하는 연구가 최근 들어 몇 가지 예가 보고 되었다.<sup>13</sup> 첫 번째는 Figure1.11 과 같이 단당류를 붙인 물질로 순수한 물이 아닌 물과 메탄올의 혼합 수용액에서 거동한다는 단점이 있다. 두 번째는 Figure1.12 와 같이 카르복실산을 붙인 물질로 물에 대한 용해도가 높지 않을 뿐만 아니라, 상대적으로 높은 카르복실산의 pKa 때문에 좁은 pH 에서의 제한된 활용성을 가진다는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 해결하고자 높은 수용성 특성을 가지며, 넓은 pH 범위를 가지는 이온성 작용기를 붙이고자 한다. 다양한 이온성 작용기 중 Figure1.15 과 같은 술폰산염을 도입하고자 하며,<sup>12h</sup> 술폰산의 pKa 는 약 -2.8 로 카르복실산의 4.76과 약 백만 배의 차이가 난다. 이를 통해 상대적으로 넓은 pH 범위 및 높은 수용성 특성을 기대할 수 있다. 수용성 고휘광성 디아릴에텐에 대한 연구는 바이오 이미지 분야에서 명암대비의 향상뿐 아니라 초고해상도 현미경의 사용으로 확대하여 해

상도 한계인 200 nm 이하의 세포의 구조와 움직임을 분석하고 이해할 수 있는 효과적인 광변색 물질로의 가능성을 보여 줄 수 있을 것이다.

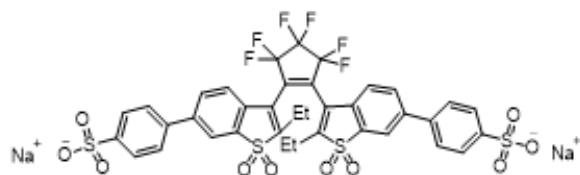


Figure 1.15 새로 디자인한 술폰전염이 달린 형광이 켜지는 디아릴에텐 (SO3-BPDBTEO)

## 1.6 참고문헌

1. (a) Serreli, V.; Lee, C. F.; Kay, E. R.; Leigh, D. A. *Nature* 2007, 445, 523–527. (b) Russell, T. P. *Science* 2002, 297, 964–967. (c) Theato, P.; Sumerlin, B. S.; O’ Reilly, R. K.; Epps, T. H., III *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 7055–7056.
2. (a) Inoue, Y.; Kuad, P.; Okumura, Y.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 6396–6397. (b) Dong, H.; Zhu, H.; Meng, Q.; Gong, X.; Hu, W. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 1754–1808. (c) Cheng, H. B.; Zhang, H. Y.; Liu, Y. J. *Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 10190–10193. (d) Cheng, H.-B.; Zhang, Y.-M.; Xu, C.; Liu, Y. *Sci. Rep.* 2014, 4, 4210–4215. (e) Gostl, R.; Senf, A.; Hecht, S. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 1982–1996.
3. Soh, N.; Yoshida, K.; Nakajima, H.; Nakano, K.; Imato, T.; Fukaminato, T.; Irie, M. *Chem. Commun.* 2007, 5206–5208.
4. 화학용어사전, 화학용어사전편찬회, 윤창주, 2011. 1. 15
5. 생명과학대사전, 초판 2008., 개정판 2014
6. (a) George H. Patterson and Jennifer Lippincott-Schwartz, *Science*, 297, 1873 (2002); (b) Ryoko Ando, Hideaki Mizuno,

- Atsushi Miyawaki, *Science*, 306, 1370 (2004); (c) Dmitriy M Chudakov, Vladislav V Verkhusha, Dmitry B Staroverov, Ekaterina A Souslova, Sergey Lukyanov & Konstantin A Lukyanov, *Nature Biotechnology*, 11, 1435 (2004); (d) Bo Huang, Wenqin Wang, Mark Bates, Xiaowei Zhuang, *Science*, 319, 810 (2008); (e) Masahiro Irie, Tuyoshi Fukaminato, Takatoshi Sasaki, Naoto Tamai & Tsuyoshi Kawai, *Nature*, 420, 759 (2002); (f) Masahiro Irie, *Chem. Rev.*, 100, 1685 (2000); (g) Zhiyuan Tian, Alexander D. Q. Li and Dehong Hu, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 1258–1260; (h) Erhan Deniz, Massimiliano Tomasulo, Janet Cusido, Ibrahim Yildiz, Marco Petriella, Mariano L. Bossi, Salvatore Sortino, and Francisco M. Raymo, *J. Phys. Chem. C* 2012, 116, 6058–6068
7. Masahiro Irie and Masaaki Mohri, *J. Org. Chem.* 1988, 53, 803–808
  8. Introduction to organic chemistry 5<sup>th</sup> edition, William Brown, Thomas Poon
  9. Masahiro Irie, *Chem. Rev.*, 2000, 100 (5), 1685–1716
  10. (a) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Wolf Lindwasser, O.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.;

- Lippincott–Schwartz, J.; Hess, H. F. *Science* 2006, 313, 1642.; (b) Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. *Biophys. J.* 2006, 91, 4258.; (c) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. *Nat. Methods* 2006, 3, 793.; (d) Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Boyarskiy, V. P.; Jakobs, S.; Hell, S. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2010, 49, 3520.
11. Kakishi Uno, Hiroyuki Niikura, Masakazu Morimoto, Yukihide Ishibashi, Hiroshi Miyasaka, and Masahiro Irie, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 13558–13564
  12. (a) Ying Zou, Tao Yi, Shuzhang Xiao, Fuyou Li, Chunyan Li, Xia Gao, Junchen Wu, Mengxiao Yu, and Chunhui Huang, *J. AM. CHEM. SOC.* 2008, 130, 15750–15751; (b) Shouzhi Pu, Hongliang Liu, Gang Liu, Bing Chen, Zhipeng Tong, *Tetrahedron* 70 (2014) 852–858; (c) Nobuaki Soh, Kenji Yoshida, Hizuru Nakajima, Koji Nakano, Toshihiko Imato, Tuyoshi Fukaminato, and Masahiro Irie, *Chem. Commun.*, 2007, 5206–5208; (d) Xuyang Yao, Teng Li, Sheng Wang, Xiang Ma and He Tiana, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 7166–7168; (e) Svetlana M. Polyakova, Vladimir N. Belov, Mariano L. Bossi, and Stefan W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* 2011,



- 3301–3312; (f) Yueyuan Mao, Keyin Liu, Guanglei Lv, Ying Wen, Xingjun Zhu, Haichuang Lan and Tao Yi, *Chem. Commun.*, 2015, 51, 6667–6670; (g) Rui Li, Cerize S. Santos, Tyler B. Norsten, Kentaro Morimitsu and Cornelia Bohne, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 1941–1943; (h) Michinori Takeshita, Nobuo Kato, Susumu Kawauchi, Tatsuya Imase, Junji Watanabe, and Masahiro Irie, *J. Org. Chem.* 1998, *63*, 9306–9313
13. (a) “Photochromic molecule” : M. Irie, C. C. Yamada, JP2012172139; (b) BenotRoubinet ,Mariano L. Bossi,Philipp Alt, Marcel Leutenegger,Heydar Shojaei, Sebastian Schnorrenberg,Shamil Nizamov, Masahiro Irie, Vladimir N. Belov,and Stefan W. Hell, *Angew.Chem. Int. Ed.* 2016, 55,15429 –15433.
14. (a) Soh, N.; Yoshida, K.; Nakajima, H.; Nakano, K.; Imato, T.; Fukaminato,T.; Irie, M. *Chem. Commun.* 2007, 5206–5208.; (b)Pedro M. Valencia, Omid C. Farokhzad, Rohit Karnik & Robert Langer, *Nature Nanotechnology*, 7, 623–629 (2012)
15. (a) Yoonkyung Kim, Hye–youn Jung, Yun Hui Choe, Chaewoon Lee, Sung–Kyun Ko, Soonil Koun, Yohan Choi,

- Bong Hyun Chung, Byoung Chul Park, Tae-Lin Huh, Injae Shin, and Eunkyong Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 2878 –2882; (b) Kenjiro Hanaoka , Kazuya Kikuchi , Shigeru Kobayashi ,and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129 (44), 13502–13509; (c) Xiaoqing Xiong, Fengling Song, Jingyun Wang, Yukang Zhang, Yingying Xue, Liangliang Sun, Na Jiang, Pan Gao, Lu Tian, and Xiaojun Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014 , 136 (27), 9590–9597.
16. Bo Huang, Hazen Babcock, and Xiaowei Zhuang, *Cell* 143, December 23, 2010

## Chapter 2. 수용성 고휘광 디아릴에텐의 합성 및 특성평가

### 2.1 도입

우수한 광물리적 및 광변색성 특성을 가진 형광이 켜지는 디아릴에텐을 바이오 이미지 분야에서 응용하기 위해 수용성 분자를 만들고자 하는 연구가 최근 들어 몇 가지 예가 보고 되었다.<sup>1</sup> 하지만 **Figure2.1** 과 같이 단당류를 붙인 경우와 **Figure2.2** 와 같이 카르복실산을 붙인 경우 물에 대한 용해도가 높지 않을 뿐만 아니라, 상대적으로 높은 카르복실산의 pKa 때문에 좁은 pH 범위에서 제한된 활용성을 가진다는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 해결하고자 높은 수용성 특성을 가지며, 넓은 pH 범위를 가지는 이온성 작용기를 붙인 분자를 디자인하고자 한다. 다양한 이온성 작용기 중 **Figure2.3** 과 같은 술폰산염을 도입하고자 하며, 이는 높은 수용성 특성, -2.8의 낮은 pKa (카르복실산의 4.76과 약 백만 배의 차이), 합성이 간단하다는 장점이 있기 때문이다. 디자인한 술폰산염이 부착된 수용성 터온 디아릴에텐을 보고된 논문을 참고하여 합성하고자 한다.<sup>2</sup> 또한 합성된 분자의 광물리적 및 광변색성 특성을 분석하여 광 스위치 방법을 이용한 바이오 이미지

분야에 적합한 분자인지 수용액 상에서 확인하고자 한다. 광물리적 특성으로는 흡광 및 발광 스펙트럼, 발광수율, 형광 수명시간을 측정하고자 한다 이를 통해 형광이 켜진 상태와 꺼진 상태의 높은 대비를 가지며, 수용액상에서 높은 발광수율 및 응집 현상이 없는지 확인하고자 한다. 광변색성 특성의 경우 광변색성 수율을 측정함으로써 photocyclization이 얼마나 빠르며, photocycloreversion은 얼마나 느린지를 확인하여 바이오이미징 하기에 적합한지 확인하고자 한다. 또한 내피로성 실험을 통해 여러 번의 실험을 진행하여도 안정적으로 형광이 가역적으로 전환 되는지를 확인하며, pH 3~10의 범위에서 형광의 세기를 비교하여 넓은 범위의 pH에서도 활용가능하다는 것을 보이고자 한다.

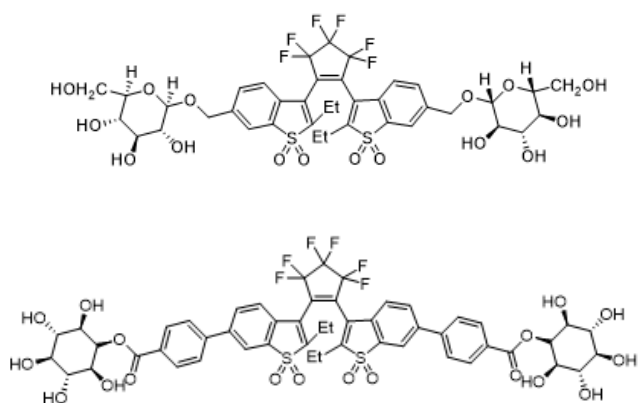


Figure 2.1 형광이 켜지는 디아릴에텐에 당당류를 붙인 수용성 광변색 물질

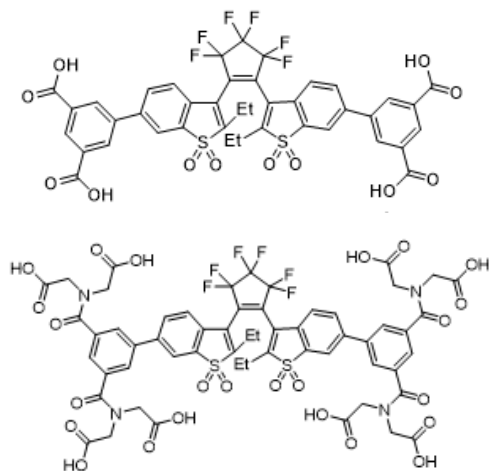


Figure 2.2 형광이 켜지는 디아릴에텐에 카르복실산을 붙인 수용성 광변색 물질

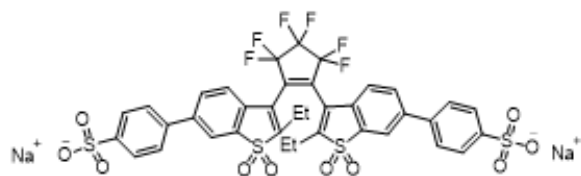


Figure 2.3 새로 디자인한 술폰전염이 달린 형광이 켜지는 디아릴에텐 (SO3-BPDBTEO)

## 2.2 실험

### 2.2.1 합성

구매가 가능한 시약은 Aldrich, TCI, Alfa Aesar 등의 업체를 통해 구매하여 사용하였다. 반응에 사용한 초자와 교반자석은 오븐에서 충분히 건조시킨 후 사용하였으며 반응진행상황은 TLC를 통해 확인하였다. TLC에서 이동하는 이동상의 위치는 UV lamp의 254, 365 nm 빛을 이용해 확인하였다. 실리카겔 크로마토그래피를 이용하여 물질을 분리하였으며 실리카겔 60 G (입자의 크기: 0.015~0.040 mm) 를 고정상으로 사용하였다. 최종물질인 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO와 참고 물질인 BPDBTEO의 합성은 **Scheme 2.1, 2.2** 의 과정으로 합성하였다. 이미 보고된 중간물질과 참고 물질은 참고문헌을 참조하여 합성하였다.<sup>2h,4,5</sup> 반응의 중간체는 Bruker AVANCE-300 <sup>1</sup>H-NMR spectrometer을 통하여 확인하고, 최종물질은 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR, 500 MHz <sup>13</sup>C-NMR, 2D-NMR(HSQC), MALDI-TOF(Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time Of Flight mass spectrometry)을 통하여 최종 확인 하였다.

### 2-Ethylbenzo[*b*]thiophene (1) 의 합성

Benzo[*b*]thiophene (25 g, 186.29 mmol)을 무수 THF 250 ml에 녹인 후  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 교반 시킨다. 그리고 2.5M의 농도를 가진 butyllithium hexane solution (223.547 mmol)을 89.41 ml을 천천히 떨어 뜨린다.  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 교반 시킨 후 ethylbromide (22.33 g, 204.918 mmol)을 천천히 떨어 뜨린다. 이후  $-78^{\circ}\text{C}$ 에서 상온까지 천천히 승온 시킨 후 12시간 동안 반응을 보낸다. 이후 혼합물은 물 300 ml와 ether 300 ml로 총 5회 추출한다. 추출된 용액을  $\text{MgSO}_4$ 을 넣어 필터를 진행하고 여과된 용액의 용매를 날린다. 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 100% *n*-hexane으로 정제하여 무색의 액상 (1)을 얻었다. (27.323 g, 수득 률: 91%).

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.97 (d,  $J=7.9$  Hz, 1.0H), 7.66 (d,  $J=7.7$  Hz, 1.0H), 7.54–7.42 (m, 2.0H), 7.17 (s, 1.0H), 3.11 (q,  $J=7.3$  Hz, 2.0H), 1.58 (t,  $J=7.5$  Hz, 3.0H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  148.03, 140.13, 139.11, 123.87, 123.21, 122.52, 121.92, 119.51, 23.91, 15.27.

### 3-bromo-2-ethylbenzo[*b*]thiophene (2) 의 합성

2-Ethylbenzo[*b*]thiophene (27.323 g, 168.4 mmol)을 THF 200 ml에 녹인 후  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 교반 시킨다. 이후 NBS (32.97 g,



185.24 mmol)을 조금씩 넣는다. 이후 0° C에서 상온까지 천천히 승온시키며 교반하고, 24시간 반응을 진행 시킨다. 이후 충분한 양의 10%의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 10% NaHCO<sub>3</sub>의 수용액을 통해 반응을 중지 시킨다. 이후 수용액과 ether 300 ml로 총 5회 추출한다. 추출된 용액을 MgSO<sub>4</sub>을 넣어 필터를 진행하고 여과된 용액의 용매를 날린다. 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 100% n-hexane으로 정제하여 무색의 액상 (2)을 얻었다. (38.4 g, 수득 률: 95%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 2.0H), 7.42–7.28 (m, 2.0H), 2.96 (q, *J* = 7.5 Hz, , 2.0H), 1.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 3.0H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 142.13, 138.37, 136.89, 124.79, 124.59, 122.48, 122.23, 105.10, 23.48, 14.70.

1,2-Bis(2-ethyl-1-benzothiophen-3-yl)perfluorocyclopenten (3) 의 합성

3-bromo-2-ethylbenzo[*b*]thiophene(10 g, 41.468 mmol)을 무수 THF 100 ml에 녹인 후, -78° C에서 교반 시킨다. 그리고 2.5 M의 농도를 가진 butyllithium hexane solution (49.762 mmol)을 19.9 ml를 천천히 떨어 뜨린다. -78° C에서 1시간동안 교반 시킨 후 otafluorocyclopentene(4.40 g, 20.734 mmol)을 천천히 떨어 뜨린다. 이후 -78° C에서 상온까지 천천히 승온 시킨 후 12시간 동안 반응을

보낸다. 이후 혼합물은 포화 염화나트륨 수용액 300 ml와 ether 300 ml로 총 5회 추출한다. 추출된 용액을  $\text{MgSO}_4$ 을 넣어 필터를 진행하고 여과된 용액의 용매를 날린다. 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 100% n-hexane으로 정제하여 흰색 파우더(3)을 얻었다. (2.13 g, 수득 률: 10.63%).

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz)  $\delta$  0.78(t,  $J = 7.8$  Hz, 4.2H), 1.29(t,  $J = 7.8$  Hz, 1.8H), 2.38–2.91(m, 4H), 7.16–7.42(m, 4H), 7.60–7.74(m, 4H). Ms (EI)  $m/z$  496( $M^+$ ). Anal. Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{F}_6\text{S}_2$ : C 60.47, H 3.65%. Found: C 60.54, H 3.67%.

1,2-Bis(2-ethyl-6-iodo-1-benzothiophen-1,1-dioxide-3-yl)perfluorocyclopentene (4) 의 합성

1,2-Bis(2-ethyl-1-benzothiophen-3-yl)per fluorocyclopenten fluorocyclopenten(2.13 g, 4.289 mmol)을 아세트산 90 ml에 넣은 후 , 리플렉스를 달은 상태에서  $118^\circ\text{C}$ 을 맞추고 30분 가량 교반 시킨다. 온도가 맞춰지면, 35%의 과산화수소 15 ml을 천천히 떨어 뜨린다. 이후 30분 동안 반응을 보낸다. 반응물은 차가운 얼음물 200 ml에 부어 석출 시킨다. 석출 물은 사기필터를 이용하여 수집하고 증류수를 통하여 수 차례 씻어 낸다. 물기를 모두 날린 후 진한 황산 40 ml에 녹인 후  $0^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 교반 시킨다. 이후 orthoperiodic acid(1.22g,

5.362mmol)과 iodine(2.42 g, 9.523 mmol)을 넣은 후 0° C에서 3시간동안 반응을 보낸다. 반응물을 300 ml의 차가운 얼음물에 천천히 떨어 뜨린 후 300 ml CHCl<sub>3</sub>를 이용하여 총 4회 추출한다. 이후 300 ml의 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액과 CHCl<sub>3</sub>를 이용하여 총 4회 추출하고, 300 ml의 포화 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 수용액과 CHCl<sub>3</sub>을 이용하여 다시 4회 추출한 후, 마지막으로 300 ml 포화 염화나트륨 수용액과 CHCl<sub>3</sub>을 이용하여 총 4회 추출한다. 추출된 용액을 MgSO<sub>4</sub>을 넣어 필터를 진행하고 여과된 용액의 용매를 날린다. 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 n-hexane : ea =1:20 →1:10 으로 정제하여 흰색 파우더(4)을 얻었다. (2 g, 수득 률: 57%).

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.06 (t, J = 7.6 Hz, 3.4H (ap)), 1.39 (t, J = 7.6 Hz, 2.6H (p)), 2.29\_2.37 (m, 1.7H (p)), 2.42\_2.59 (m, 2.3H (ap)), 6.80(d, J = 8.4 Hz, 0.9H (p)), 6.91 (d, J = 8.4 Hz, 1.1H (ap)), 7.79 (dd, J = 8.4 and 1.6 Hz, 0.9H (p)), 7.95 (dd, J = 8.4 and 1.6 Hz, 1.1H (ap)), 8.00 (d, J= 1.6 Hz, 0.9H (p)), 8.06 (d, J = 1.6 Hz, 1.1H (ap)); MS (EI) m/z (M<sup>+</sup>)812; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.45, 11.68, 19.08, 19.24, 96.37, 122.68, 122.84, 123.49, 123.87, 128.67, 128.79, 131.30, 131.33, 136.94, 142.42, 142.76, 148.00, 148.48. Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>16</sub>F<sub>6</sub>I<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>: C, 36.96; H, 1.99; S, 7.89. Found: C, 36.97; H, 1.91; S, 7.85.

1,2-Bis(2-ethyl-6-phenyl-1-benzothiophen-1,1-dioxide-3-yl)perfluorocyclopentene (5, BPDBTEO) 의 합성

1,2-Bis(2-ethyl-6-iodo-1-benzothiophen-1,1-dioxide-3-yl)perfluorocyclopentene(2 g, 2.462 mmol)과 phenylboronic acid(0.763 g, 6.254 mmol)을 THF 100 ml에 녹인 후 상온에서 교반시킨다. 이후 포화 탄산칼륨 수용액을 100ml 넣고 tris(dibenzylideneacetone)-dipalladium(0) (0.401 g, 0.4383 mmol)와 18% tricyclohexylphosphine toluene solution 1.34 ml을 넣고 상온에서 3시간동안 반응을 보낸다. 반응물은 묽은 염산을 이용하여 중화 시킨 후 300 ml의 CHCl<sub>3</sub>를 이용하여 총 4회 추출한다. 추출된 용액을 MgSO<sub>4</sub>을 넣어 필터를 진행하고 여과된 용액의 용매를 날린다. 남은 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 n-hexane : ea =9:1 →7:1 으로 정제하여 흰색 파우더(5)을 얻었다. (1.4 g, 수득 률: 80%).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 1,4-dioxane-d<sub>8</sub>) δ 1.04 (t, J = 7.6 Hz, 3.7H (ap)), 1.37 (t, J = 7.6 Hz, 2.3H (p)), 2.45\_2.51 (m, 1.6H (p)), 2.59\_2.70 (m, 2.4H (ap)), 7.34\_7.50 (m, 8H), 7.62 (d, J = 7.2 Hz, 1.6H (p)), 7.67 (d, J= 7.2 Hz, 0.8H (p)), 7.71 (d, J = 7.2 Hz, 2.4H (ap)), 7.87 (d, J = 7.2 Hz, 1.2H (ap)), 8.16 (s, 0.8H (p)), 8.22 (s,

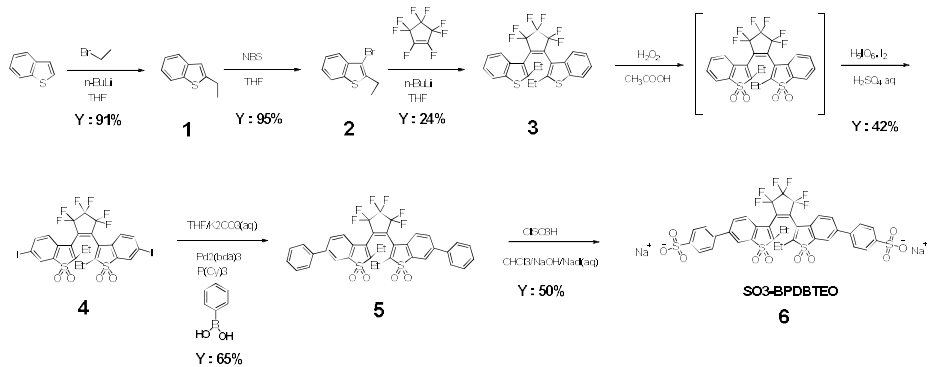
1.2H (ap));  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.64, 11.92, 19.17, 19.29, 121.05, 122.88, 123.08, 123.25, 123.34, 127.07, 127.11, 127.99, 128.07, 128.96, 129.04, 129.22, 129.29, 131.80, 132.17, 136.51, 138.08, 144.39, 144.52, 148.15, 148.56; MS (EI)  $m/z$  ( $M^+$ ) 712. Anal. Calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{O}_4\text{S}_2$ : C, 62.35; H, 3.68; S, 9.00. Found: C, 62.55; H, 4.02; S, 8.92.

sodium 4,4'-((perfluorocyclopent-1-ene-1,2-diyl)bis(2-ethyl-1,1-dioxidobenzo[b]thiophene-3,6

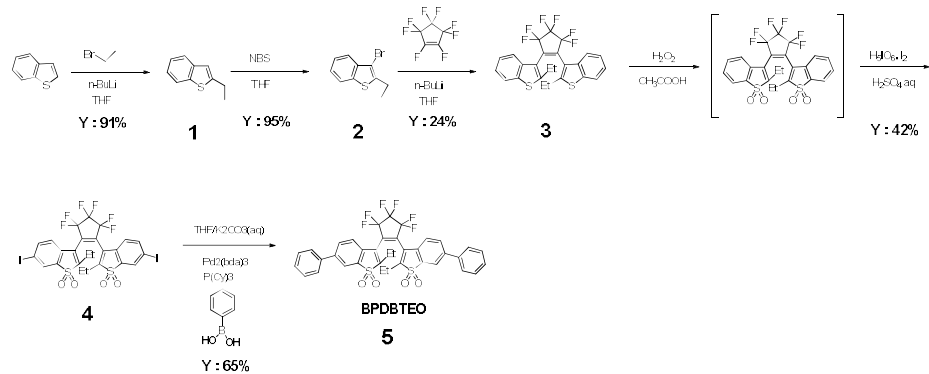
diyl))dibenzenesulfonate (6,  $\text{SO}_3\text{-BPDBTEO}$ )의 합성

1,2-Bis(2-ethyl-6-phenyl-1-benzothiophen-1,1-dioxide-3-yl)perfluorocyclopentene (100mg, 0.14mmol)을  $\text{CHCl}_3$  1.5 ml에 완전히 녹인 후 상온에서 교반시킨다. 이후  $\text{ClSO}_3\text{H}$  (46mg, 0.393mmol)을 천천히 떨어 뜨린 후 상온에서 2시간동안 반응 보낸다. 이후 1%  $\text{NaOH}$  수용액 5 ml을 떨어 뜨린 후 5분뒤 포화 염화나트륨 수용액 5 ml을 떨어 뜨린다. 석출된 물질을 사기 필터를 이용하여 수집한 후  $\text{CHCl}_3$ 를 이용하여 씻어낸다. 이후 석출된 물질을 20 ml의 에탄올에서 가열한 후 석출된 물질을 멤브레인 필터를 이용하여 수집하고 에탄올을 이용하여 씻어내고 흰색의 파우더 (6)을 얻었다. (65 mg, 수득 률: 50%).

ap:p=70:30.  $^1\text{H}$  NMR(300 MHz, MeOD)  $\delta$  [ppm]: 1.01(t, 4.2H(ap)), 1.40(t, 1.85H(p)), 2.47(m, 1.39H(p)), 2.68(m, 2.45H(ap)), 7.54(d, 1.18H(ap)), 7.57(d, 0.67H(p)), 7.72(d, 0.99(p)), 7.89(d, 2.51H(ap)), 7.95(m, 1.48H(p)), 7.98(d, 2.59H(ap)), 8.06(d, 0.66H(p)), 8.08(m, 1.14H(ap)), 8.19(d, 1.17H(ap)),  $^{13}\text{C}$  NMR (500MHz, MeOH)  $\delta$  12.228, 12.499, 20.208, 20.446, 121.973, 124.529, 124.591, 125.413, 128.010, 128.095, 128.341, 128.385, 129.494, 129.786, 133.918, 134.250, 137.947, 138.164, 141.181, 141.252, 144.926, 144.953, 146.889, 146.994, 150.277, 150.367, MALDI-TOF-MS (m/z): 916.94 (M+H)<sup>+</sup>



**Scheme 2.1** SO3-BPDBTEO의 합성 과정.



**Scheme 2.2** BPDBTEO의 합성 과정.<sup>4</sup>

### 2.2.2 DFT 계산

최적화된 분자구조와 광학적, 전기화학적, 광 물리적 특성을 예측하고자 DFT와 TD-DFT계산을 진행하였다. (basis set: B3LYP 6-31G d, p) 모든 계산은 3D chemdraw을 통해 mol2파일을 만든 후, Gaussian 09 package를 통해 이루어졌다.

### 2.2.3 측정장비

흡광 스펙트럼은 Shimadzu UV-1650-PC를 사용하여 250부터 800 nm까지 측정하였다. 발광 스펙트럼은 Varian, Cary Eclipse 형광분광광도계와 Photo Technology International, Felix32 QM-40 형광분광광도계를 사용하였다. 발광수율 (PLQY)는 Photo Technology International, Felix32 QM-40 형광분광광도계와 Shimadzu UV-1650-PC을 이용하여 참고 물질인 fluorescein을  $10^{-5}$  M 농도의 0.1 M NaOH용액으로 샘플링 하여 상대발광수율을 구하였다. TCSPC 실험은 PicoQuant사의 Picoharp을 사용하여 측정하였고, 377 nm laser source를 사용하였다. 자료 분석은 PicoQuant Fluofit 소프트웨어를 사용하였다.



#### 2.2.4 광변색성 실험

모든 실험은  $10^{-5}$  M 메탄올 용액, 수용액, KCl 완충 용액에서 진행하였다. SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 의 처음 상태와 광평형 상태의 흡광 및 발광 스펙트럼을 측정하기 위해 사용된 광원은 UV lamp 의 365 nm 광원과 자체 제작한 Blue LED 의 450 nm 으로 내피로성 실험의 광원과 동일하다. cyclization 과 cycloreversion 의 경우 큐벳과 광원의 거리가 5 cm 로 동일하게 유지하였으며, 각각 3 분, 12 분이 소요되었다. 광변색성 수율 실험은 UV lamp 의 365 nm 광원과 300W Xe lamp 에 450 nm 의 monochromator 를 설치한 광원을 큐벳과의 거리가 50 cm 가 되도록 유지하였다. 광물리적 실험을 하는 경우와 달리 상대적으로 광원과 큐벳과의 거리가 멀며 더 약한 광원을 사용한 이유는 **Figure2.4** 와 같이 광변색 현상의 초반 직선구간의 기울기를 구하기 위함이다.<sup>1d</sup> 이때 상대적으로 빠른 cyclization 의 경우는 20 초 단위로 닫힌 형태의 흡수 증가를 측정하였고, cycloreversion 은 상대적으로 느리므로 5 분단위로 닫힌 형태의 흡수 감소를 측정하였다. pH 실험은 KCl 100 mmol 완충용액을 사용하였다. UV lamp 의 365 nm 광원을 큐벳과의 거리가 5 cm 에서 3 분 동안 켜어준 후 광평형상태로 만들고 측정하였다.

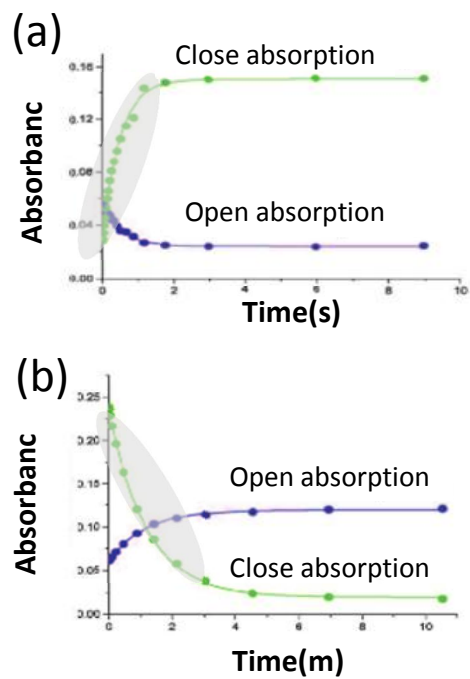


Figure 2.4 광변색 현상으로 인한 닫힌 형태의 흡수 변화(초반 직선 구간을 표기) (a) cyclization, (b) cycloreversion<sup>1d</sup>

## 2.3 결과 및 논의

### 2.3.1 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 합성

반응의 중간체는 Bruker AVANCE-300 <sup>1</sup>H-NMR spectrometer을 통하여 확인하고, 최종물질인 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO는 MeOD 용액에서 **Figure 2.5** 와 같이 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR, **Figure2.6** 과 같이 500 MHz <sup>13</sup>C-NMR을 통하여 물질을 확인하였다. **Figure2.7** 과 같이 2D-NMR(HSQC)을 통해 벤젠의 파라 위치에 술폰산염이 달려 있다는 것을 확인하였으며, 메탄올에서 **Figure2.8** 과 같이 MALDI-TOF(Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time Of Flight mass spectrometry)을 통하여 예상 분자량 916에 수소분자가 하나가 붙은 916.94로 물질을 최종 확인 하였다.

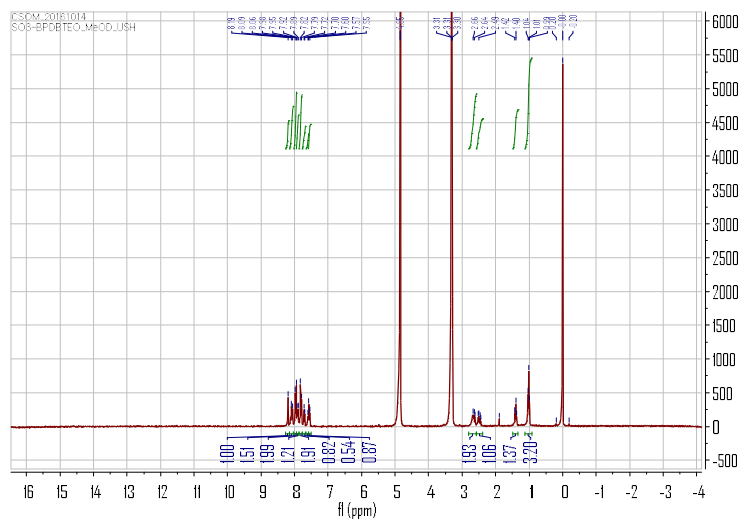


Figure 2.5 SO3-BPDBTEO MeOD 용매에서, 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과.

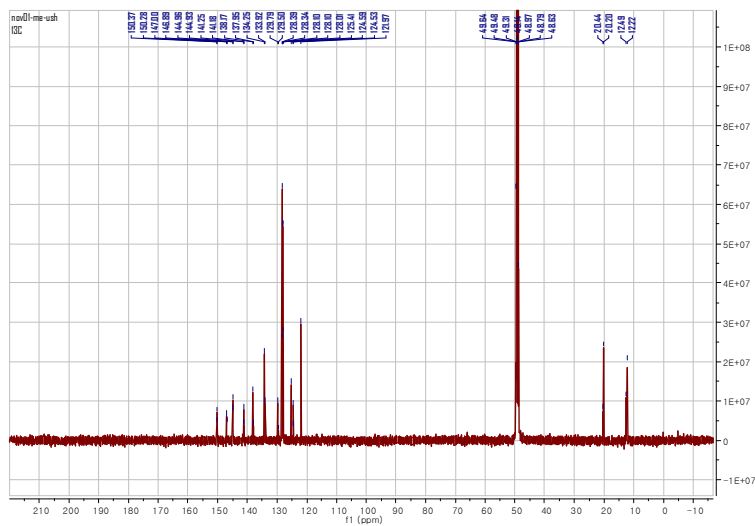


Figure 2.6 SO3-BPDBTEO MeOD 용매에서, 500 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR을 찍은 결과.

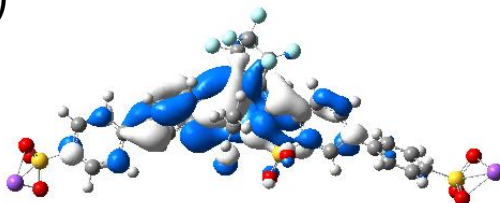


### 2.3.2 밀도 범 함수 이론 (DFT) 계산

설계된 분자의 최적화된 구조, 이론적 HOMO, LUMO 준위 등의 계산을 통해 디자인한 분자의 광변색성 현상 및 기본적인 특성을 예측하고자 물에서의 DFT 계산을 진행하였다.

**Figure2.9** 과 같이 디자인된 열린 형태의 디아릴에텐의 HOMO, LUMO 분자 오비탈을 비교하였을 때, HOMO에서 상대적으로 넓게 분포 되어 있는 전자 구름의 분포가 LUMO에서 할상탄소 가 있는 중앙 지역으로 전자구름이 모이는 것을 알 수 있다. 이러한 현상을 통해 광변색성 현상이 효율적으로 일어 난다는 것을 예측 할 수 있었다.<sup>6</sup> 이외에도 TD-DFT 계산을 진행 하였다. **Table2.1** 에서 보는 바와 같이 HOMO에서 LUMO의 전이 비율이 가장 높은 것을 알 수 있었으며, 이때의  $\Delta E_{S_1-S_0}$  은 3.5003 ev로 흡수 파장은 354.21 nm라는 것을 알 수 있다. 이외에도 oscillating strength (f)=0.409 로 상당히 높은 흡수 값을 가질 것으로 예측 할 수 있었다. 이를 통해 디자인한 물질이 광변색성 현상이 효과 적으로 일어나며, 바이오 이미징에 사용하기 위해 필요한 높은 흡수계수를 가지는 것을 예측 할 수 있었다.

(a)



(b)

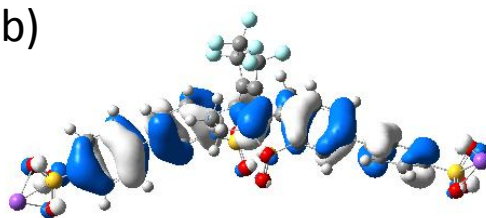


Figure 2.9 SO3-BPDBTEO의 HOMO/LUMO 전자 구름 분포. (a) LUMO의 전자구름 분포 (b)HOMO의 전자구름 분포

DFT calculation						
SO3-BPDBTEO(H2O)	Oscillating strength (f)	LUMO (eV)	HOMO (eV)	$\Delta E_g$ (eV)	$\Delta E_{S1-S0}$ (eV)	Absorption (nm)
	0.409	-2.463	-6.444	3.981	3.5	354.21

Table 2.1 SO3-BPDBTEO의 DFT 계산 결과

### 2.3.2 광 물리적 특성

Figure 2.10 은  $10^{-5}$  M 의 수용액에서 UV lamp 의 365 nm를 조사하기 전, Blue Led의 450 nm 광원을 사용하여 열린 형태의 흡광 및 형광을 확인하였다. 또한 UV lamp 의 365 nm를 3분동안 조사하여 광평형 상태를 만들었다. 이후 Blue Led의 450 nm 광원을 사용하여 광평형상태의 흡광 및 형광을 확인하였다. 사진을 통해 열린 형태에서는 형광이 없으며, 광평형상태에서 닫힌형태에 의해 강한 노랑 형광이 나온다는 것을 육안으로 확인하였다. Figure 2.11, 2.12 는  $10^{-5}$  M 농도의 물과 메탄올 용매 하에 얻은 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 흡광 및 발광 스펙트럼 이다. Table 2.2 에서 보듯이 메탄올과 물에서 강한 노랑색 형광을 가지며, 각각  $\square_{F,H_2O} = 0.45$ ,  $\square_{F, MeOH} = 0.65$ 의 발광수율을 가진다는 것을 알 수 있다. 이때의 발광 수율은 fluorescein 을 0.1 M 수산화나트륨 용액에  $10^{-5}$  M의 농도로 만든 참고 물질의 발광수율과 비교하여 측정하였다. 또한 메탄올에서의 흡수 및 발광 스펙트럼을 보면 열린 형태는  $\lambda_{ab} = 335$  nm의 흡수를 가지며, 발광하지 않는다는 것을 알 수 있다. 닫힌 형태의 경우는  $\lambda_{ab} = 454$  nm 의 흡수를 가지고,  $\lambda_{emi} = 528/555$  nm의 쌍봉의 발광스펙트럼을 가진다는 것을 알 수 있다. 반면 물에서의 흡수 및 발광 스펙트럼을 보면 열린 형태는  $\lambda_{ab} = 335$ nm의 흡수를 가지며, 발광하지 않는다는 것을 알 수 있다. 닫힌 형태의 경우는  $\lambda_{ab} = 450$  nm의 흡수를 가지고,  $\lambda_{emi} = 526/552$



nm의 쌍봉의 발광스펙트럼을 가진다는 것을 알 수 있다. 이를 통해 **Figure2.13** 과 같이 파장의 이동이 크지 않고 용매의 극성이 증가 함에 따라 발광 수율만 떨어 진다는 것을 알 수 있다. **Figure2.14** 는 발광 수율이 떨어 지는 것을 추가적으로 확인 하기 위해 TCSPC 실험을 통해  $10^{-5}$  M 농도의 물과 메탄올 용매 하에 얻은 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 발광 수명을 측정하였다. 결과 **Table2.3** 에서 보듯이 2.48 ns에서 1.70 ns으로 줄어 드는 것을 확인 하였다. 이를 통해 물에서 물질의 응집 현상이 거의 없다는 것을 알 수 있었고, 높은 발광 수 율과 흡수 계수를 가진다는 것을 알 수 있었다.

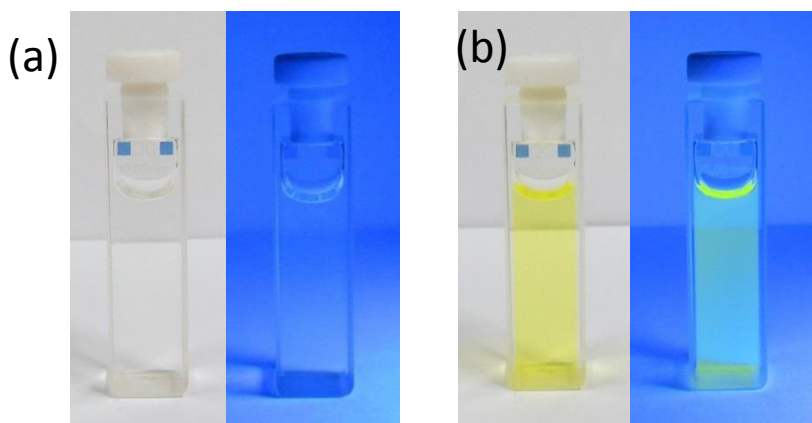


Figure 2.10 SO3-BPDBTEO  $10^{-5} M$  수용액의 흡광 및 발광 사진. (a) UV lamp 365 nm 광원 조사 전 열린형태의 형광, (b) UV lamp 365 nm 광원 조사 후 광평형 상태의 형광.( 형광은 Blue Led의 450 nm로 관측)

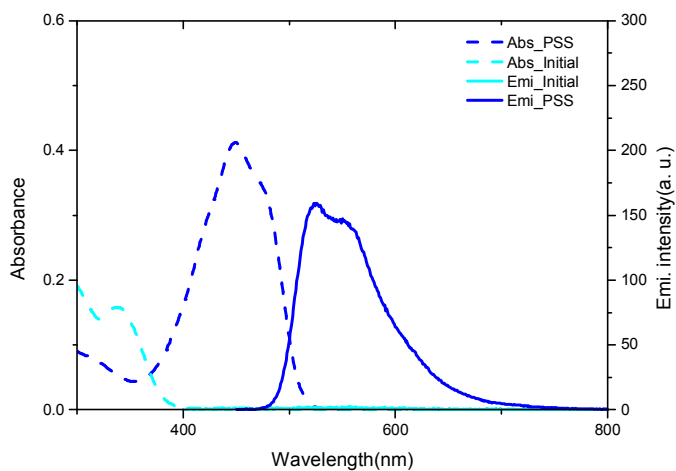


Figure 2.11 SO3-BPDBTEO  $10^{-5} M$  수용액의 흡광 및 발광 스펙트럼과  
 라색선은 닫힌 이성질체, 하늘색선은 열린 이성질체의 스펙트럼

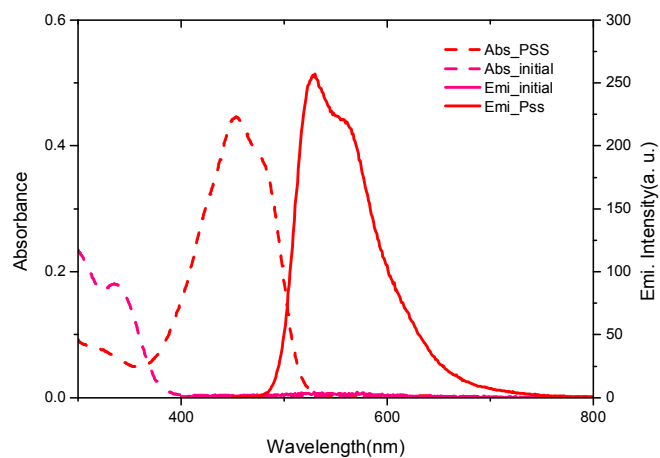


Figure 2.12 SO3-BPDBTEO  $10^{-5} M$  메탄올 용액의 흡광 및 발광 스펙트럼  
 럼 빨강색선은 닫힌 이성질체, 핑크색선은 열린 이성질체의 스펙트럼

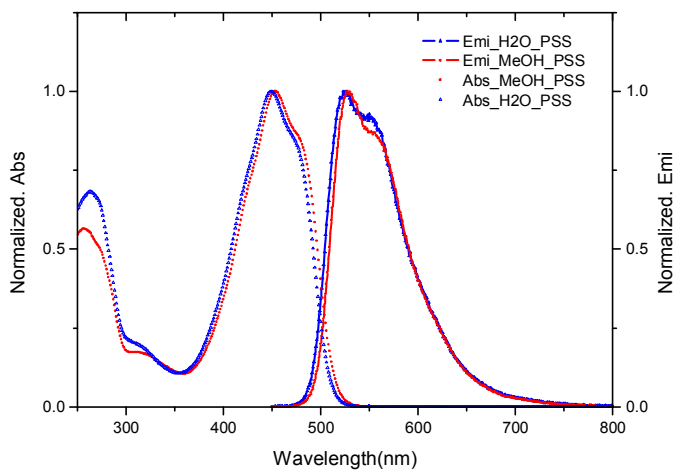


Figure 2.13 SO3-BPDBTEO  $10^{-5} M$  수용액과 메탄올에서의 흡광 및 발광  
 스펙트럼 비교. 파랑색선은 수용액, 빨강색은 메탄올 용액.

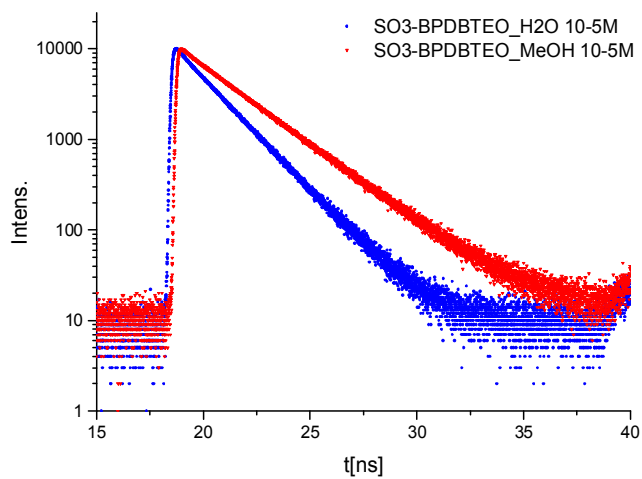


Figure 2.14 SO3-BPDBTEO  $10^{-5}$  M 수용액과 메탄올에서의 형광 수명시간 비교. 빨강색은 메탄올 용액, 파랑색은 수용액.

	Open-ring isomer			Closed-ring isomer			
	Abs ( $\lambda_{\text{max}}=\text{nm}$ )	Emi ( $\lambda_{\text{max}}=\text{nm}$ )	$\Phi\text{F}$	Abs ( $\lambda_{\text{max}}=\text{nm}$ )	Emi ( $\lambda_{\text{max}}=\text{nm}$ )	$\Phi\text{F}$	Isosbesitic point(nm)
H <sub>2</sub> O	335	-	-	450	526/552	0.45	369
MeOH	335	-	-	454	528/555	0.65	369

Table 2.2 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO  $10^{-5} M$  수용액과 메탄올에서의 광 물리적 특성. 열린 이성질체의 흡광 파장, 닫힌 이성질체의 흡광 파장, 발광 파장, 상대적 발광 수율. 등흡수점

	Open-ring isomer				Closed-ring isomer			
	Life time(ns)	$\Phi\text{F}$	Radiative constant( $k_r$ )	Non-radiative constant( $k_{nr}$ )	Life time(ns)	$\Phi\text{F}$	Radiative constant( $k_r$ )	Non-radiative constant( $k_{nr}$ )
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	1.70	0.45	0.765	0.935
MeOH	-	-	-	-	2.48	0.65	1.612	0.868

Table 2.3 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO  $10^{-5} M$  수용액과 메탄올에서의 광 물리적 특성. 닫힌 형태의 상대적 발광수율, 형광 수명 시간, 무방사 및 방사 속도상수

### 2.3.2 광변색성 수율

디아릴에텐의 광변색 수율은 정 반응인 photocyclization과 역 반응이 photocycloreversion 2가지로 나뉘게 된다. Photocyclization의 경우 UV lamp의 365 nm 광원을 샘플로부터 50cm 떨어진 곳에서 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-5</sup> M의 수용액 및 메탄올 용액과 BPDBTEO 10<sup>-5</sup> M dioxane 용액을 20초 단위로 쏘여주며 측정하였고, photocycloreversion의 경우 300W Xe lamp 에 450 nm의 monochromator 을 장착하여 광원을 샘플로부터 50 cm 떨어진 곳에서 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-5</sup> M의 수용액 및 메탄올 용액의 경우 5분 단위로 광원을 쏘여주며, BPDBTEO 10<sup>-5</sup> M dioxane 용액은 15분 단위로 광원을 쏘여 주며 측정하였다. 광원을 샘플로부터 떨어 뜨리는 이유는 광변색 반응의 초반구간의 직선 구간을 구하기 위함이다.

우선 photocyclization의 경우 모두 열린 형태를 만들어 준 후 365 nm의 광원이 쏘여주게 되면 열린 형태의 흡수가 줄어들고, 닫힌 형태의 흡수가 늘어나게 된다. 이때 증가 하는 닫힌 형태의 흡수를 시간에 따라 그래프를 그리게 되는데, 닫힌 형태의 흡수 계수는 열린 형태와 다르기 때문에 아래 와 같은 보정을 통해 흡수 값을 구하게 된다.<sup>7</sup>

$$\frac{A_{\text{쏘여준 광원의 파장}}}{1 - 10^{-A_{\text{닫힌 형태의 최대 흡수 파장}}}}$$

이렇게 보정된 흡수의 값을 시간에 따라 그래프를 그리게 되면 **Figure2.15, 2.16** 과 같이 메탄올과 물에서의 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 양의 기울기를 가지는 직선 그래프를 그릴 수 있게 된다. **Table2.4** 에서 보듯이 알려진 물질인 BPDBTEO의 기울기와 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 메탄올과 물에서의 각각의 기울기를 구하여 그 비를 구하고 BPDBTEO의 cyclization Quantum Yield인 0.42를 아래의 수식에 대입 시 그 값을 구할 수 있게 된다.

$$\Phi_{O \rightarrow C, SO_3-BPDBTEO} = \frac{\Phi_{slope, SO_3-BPDBTEO}}{\Phi_{slope, BPDBTEO}} \times 0.420$$

위의 수식에 대입 시 물에서는  $\Phi_{O \rightarrow C, SO_3-BPDBTEO, H_2O} = 0.216$ , 메탄올에서는  $\Phi_{O \rightarrow C, SO_3-BPDBTEO, MeOH} = 0.305$ 의 값으로 물에서 더 느린 것을 확인할 수 있다.

cycloreversion의 경우 물질을 광평형상태로 바꾸어 준 후 450 nm의 광원을 쬔 후 시간에 따라 단힌 형태의 흡수가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이 외에도 cyclization에 비해 느리게 일어나기 때문에 분단위로 측정하였다. SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 경우가 BPDBTEO보다 빨리 변하는 것을 확인 하여, BPDBTEO의 경우는 15분 단위, SO<sub>3</sub>-BPDBTEO는 5분 단위로 측정을 하였다. 이때 쬔 광원은 450 nm로

cyclization의 방법과 동일하게 측정을 하였다. 이를 통해 **Figure2.17**, **2.18** 과 같이 메탄올과 물에서의 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 음의 기울기를 가지는 직선 그래프를 그릴 수 있게 된다. **Table2.5** 에서 보듯이 알려진 물질인 BPDBTEO의 기울기와 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 메탄올과 물에서의 각각의 기울기를 구하여 그 비를 구하고 BPDBTEO의 cycloreversion quantum yield인  $4.0 \times 10^{-4}$ 를 아래의 수식에 대입 시 그 값을 구할 수 있게 된다.

$$\Phi_{C \rightarrow O, SO_3-BPDBTEO} = \frac{\Phi_{slope, SO_3-BPDBTEO}}{\Phi_{slope, BPDBTEO}} \times 4.000 \times 10^{-4}$$

위의 수식에 대입 시 물에서는  $\Phi_{C \rightarrow O, SO_3-BPDBTEO, H_2O} = 8.669 \times 10^{-4}$ , 메탄올에서는  $\Phi_{C \rightarrow O, SO_3-BPDBTEO, MeOH} = 7.412 \times 10^{-4}$ 의 값으로 물에서 더 빠른 것을 확인 할 수 있다.

**Table2.4**, **2.5** 에서와 같이 물에서 photocyclization quantum yield는 더 느리고, photocycloreversion quantum yield는 더 빠른 것을 알 수 있다. 이를 분석하기 위해 각각 <sup>1</sup>H-NMR, 발광수율, 수명시간을 이용하였다.<sup>8,4</sup> 디아릴에텐의 경우 열린 형태는 2가지의 형태를 가지게 된다. 광활성을 가진 역 평행형태와 광활성이 없는 평행형태이다.<sup>8</sup> 역 평행형태의 경우 닫힌 형태와 그 구조가 비슷하여 우드워드 호프만 법



칙에 의해 고리화 반응이 일어날수 있게 된다. photocyclization quantum yield의 경우 광활성이 있는 역 평행 형태의 비율이 높게 존재 할수록 높은 값을 가지게 된다. 이때 역평행 형태의 안정성은 용매의 극성이 낮아 질수록 증가하게 되는데, 이는 상대적으로 극성이 낮은 메탄올에서 보다 높은 cyclization quantum yield를 가지는 것을 통해 확인할 수 있다. 이 것은  $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 확인 할 수 있게 된다. **Figure2.19, 2.20** 과 같이 메탄올 100%의  $^1\text{H-NMR}$  을 통해 다음과 같이 역평행형태와 평행형태의 비율을 구할 수 있게 된다. 그 결과 Table에서 보듯이 이 나오는 것을 확인 할 수 있다. 여기에 물을 첨가 하며 물과 메탄올의 비율이 0 : 100, 30 : 70, 50 : 50, 70 : 30으로 물의 비율을 증가 시킴에 따라 **Figure2.21, 2.22, 2.23, 2.24, 2.25, 2.26** 와 **Table2.6** 과 같이 평행형태와 역 평행 형태의 비가 줄어 든 것을 확인 할 수 있다.

photocycloreversion quantum yield의 경우 물에서 더 빠른 것을 확인 할 수 있었는데, 이것은 발광수율과 수명시간를 통해 확인 할 수 있다. cycloreversion의 경우 빛 에너지를 받고 포톤으로 방출하는 방사 통로가 아닌 무방사 통로에 의한 에너지 소모이다. 이때 발광 수 율과 수 명시간을 아래의 수식을 통해 방사상수( $k_r$ )와 무방사상수( $k_{nr}$ )를 구하게 되면 Table과 같이 얻을 수 있게 된다.

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (\Phi_F : \text{발광수율}, k_r : \text{방사상수}, k_{nr} = \text{무방사상수})$$

메탄올에서 발광수율은 0.65로 물에서의 0.45보다 높게 측정이 되었지만, 무방사 상수를 보게 되면 메탄올의 경우 0.868, 물은 0.935 인 것을 알 수 있다. 이것은 흡수된 에너지의 대부분이 방사통로를 통하여 방출되고, cycloreversion에는 사용 되지 못한다는 것을 의미한다. 이로 인해 메탄올에서 더 느린 cycloreversion quantum yield를 가지게 된다는 것을 확인 할 수 있다.

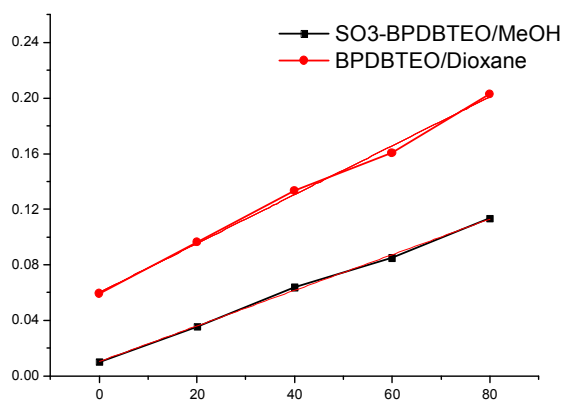


Figure 2.15 SO3-BPDBTEO  $10^{-5}M$  메탄올 용액과 BPDBTEO  $10^{-5}M$  Dioxane 용액의 cyclization 실험. 각각의 결과를 linear fit한 결과

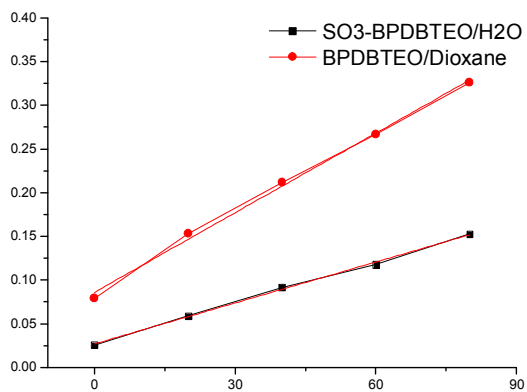


Figure 2.16 SO3-BPDBTEO  $10^{-5}M$  수용액과 BPDBTEO  $10^{-5}M$  Dioxane 용액의 cyclization 실험. 각각의 결과를 linear fit한 결과

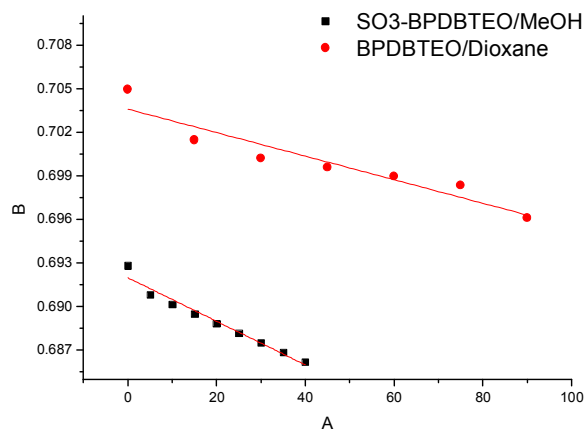


Figure 2.17 SO3-BPDBTEO  $10^{-5}M$  메탄올 용액과 BPDBTEO  $10^{-5}M$  Dioxane 용액의 cycloreversion 실험. 각각의 결과를 linear fit한 결과

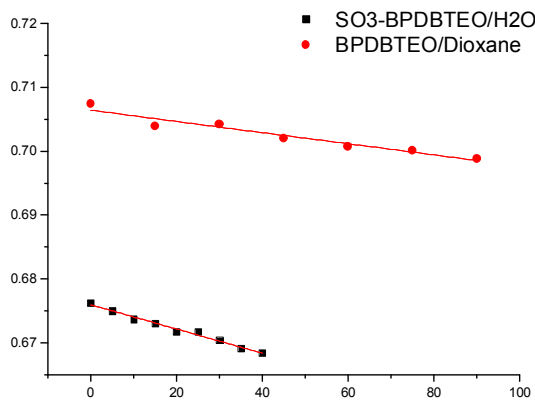


Figure 2.18 SO3-BPDBTEO  $10^{-5}M$  수용액과 BPDBTEO  $10^{-5}M$  Dioxane 용액의 cycloreversion 실험. 각각의 결과를 linear fit한 결과

Cyclization Quantum Yield					
	Slope(BPDBTEO) Dioxane	Slope(SO3-BPDBTEO)	$R^2$ (BPDBTEO) Dioxane	$R^2$ (SO3-BPDBTEO)	Cyclization Quantum yield
H <sub>2</sub> O	0.00303	0.00156	0.9957	0.99795	0.216
MeOH	0.00176	0.00128	0.99569	0.99794	0.305

Table 2.4 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-5</sup>M 수용액과 메탄올에서의 Photocyclization 특성. (참고물질인 BPDBTEO의 알려진 0.42의 값과 기울기 비를 통하여 구한다.)

Cycloreversion Quantum Yield					
	Slope(BPDBTEO) Dioxane	Slope(So3-BPDBTEO)	$R^2$ (BPDBTEO) Dioxane	$R^2$ (SO3-BPDBTEO)	Cyclization Quantum yield
H <sub>2</sub> O	-8.74412 × 10 <sup>-5</sup>	-1.89498 × 10 <sup>-4</sup>	0.9264	0.88299	8.669 × 10 <sup>-4</sup>
MeOH	-8.1032 × 10 <sup>-5</sup>	-1.50155 × 10 <sup>-4</sup>	0.9834	0.96395	7.412 × 10 <sup>-4</sup>

Table 2.5 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-5</sup>M 수용액과 메탄올에서의 Photocycloreversion 특성. (참고물질인 BPDBTEO의 알려진 4.0 × 10<sup>-4</sup>의 값과 기울기 비를 통하여 구한다.)

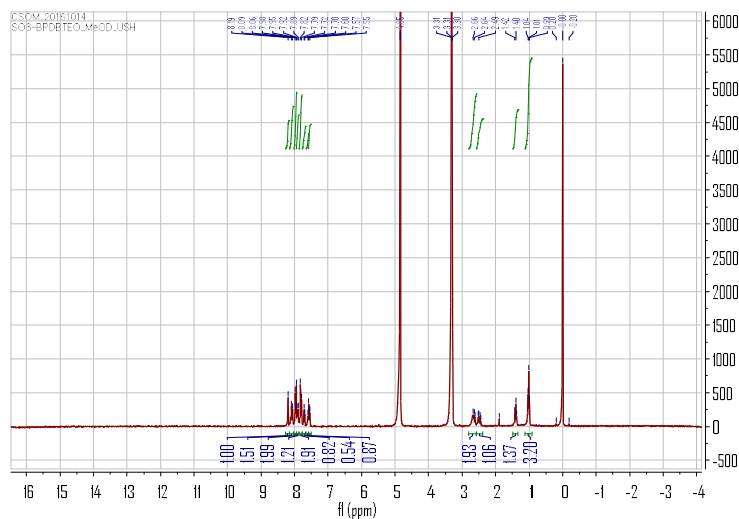


Figure 2.19 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 100 : 0 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 전체 이미지.

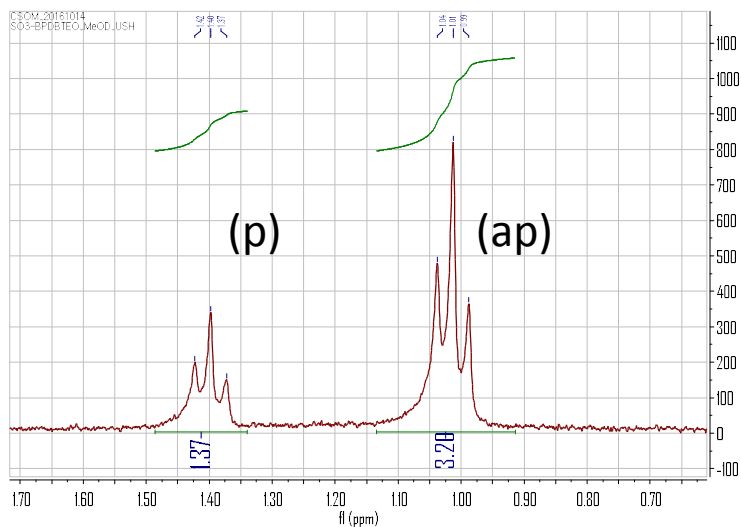


Figure 2.20 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 100 : 0 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지

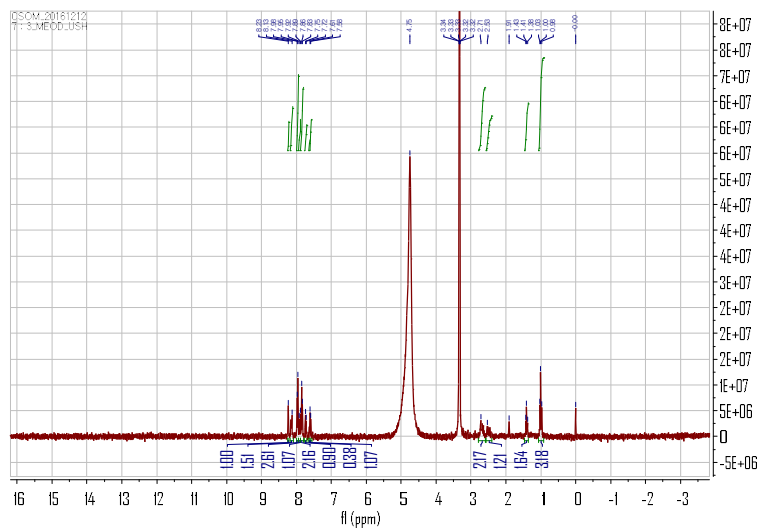


Figure 2.21 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 70 : 30 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 전체 이미지

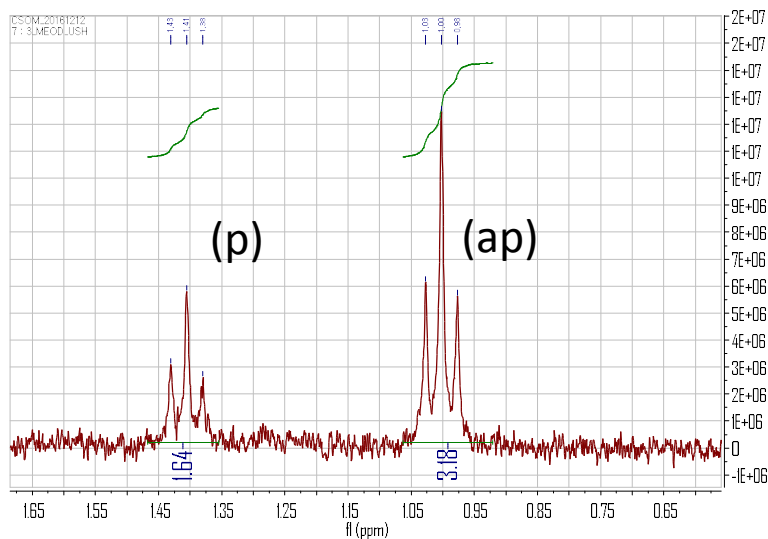


Figure 2.22 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 70 : 30 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지

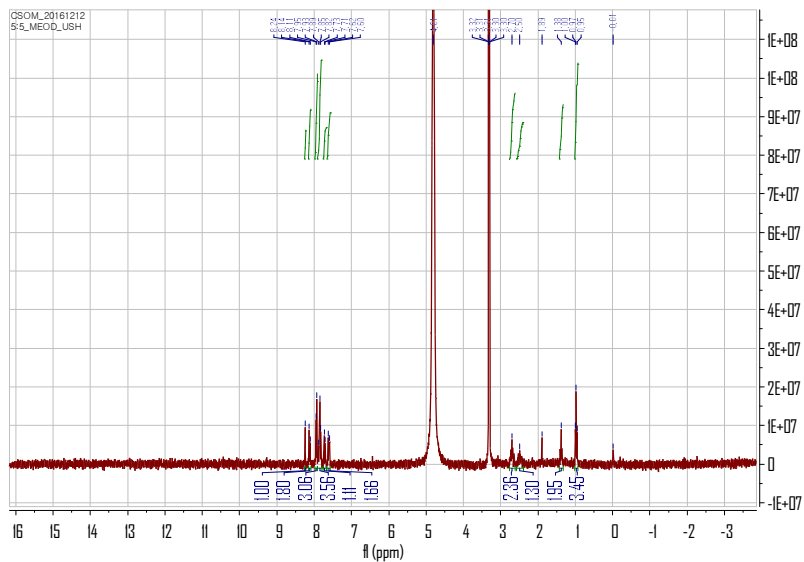


Figure 2.23 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 50 : 50 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 전체 이미지.

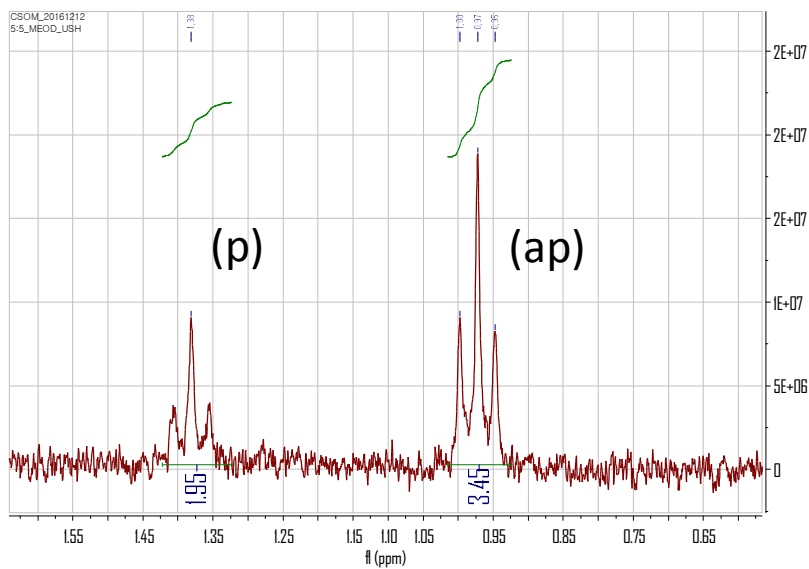


Figure 2.24 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 50 : 50 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지.



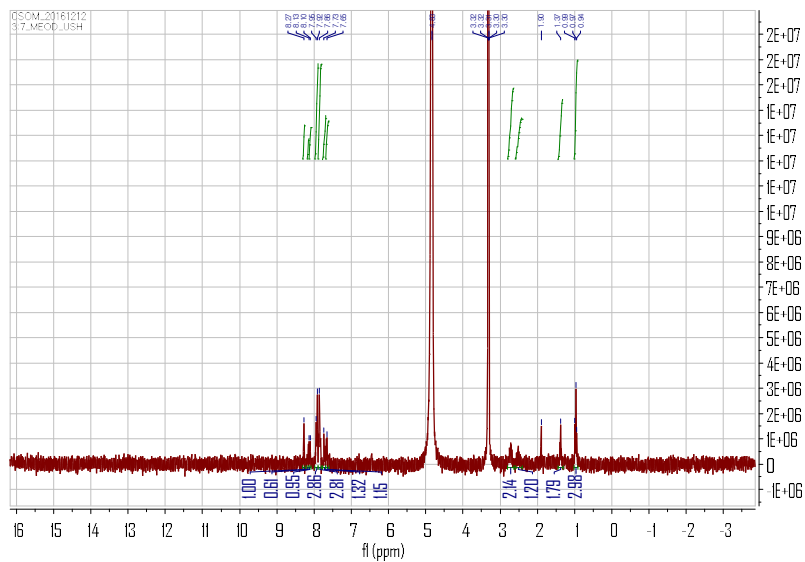


Figure 2.25 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 30 : 70 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 전체 이미지.

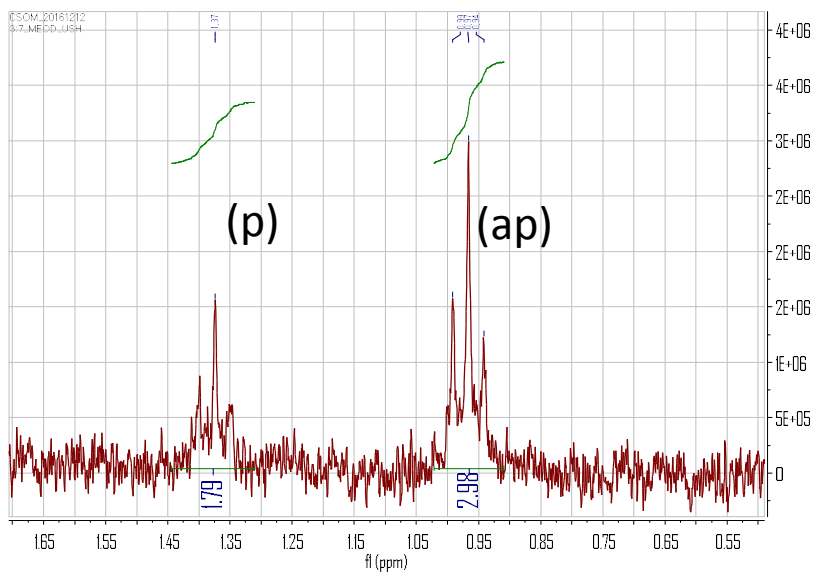


Figure 2.26 SO3-BPDBTEO MeOD : D2O = 30 : 70 의 비율로  $^1\text{H}$ -NMR을 찍은 결과. 알리파틱을 확대한 이미지

<b>ap : p ratio</b>			
	<b>ap</b> (integral area)	<b>p</b> (integral area)	<b>ap : p</b>
<b>MeOH : H<sub>2</sub>O=100 : 0</b>	1.40	3.27	70 : 30
<b>MeOH : H<sub>2</sub>O=70 : 30</b>	1.64	3.18	66 : 34
<b>MeOH : H<sub>2</sub>O=50 : 50</b>	1.95	3.45	64 : 36
<b>MeOH : H<sub>2</sub>O=30 : 70</b>	1.79	2.98	62 : 38

Table 2.6 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 MeOD : D<sub>2</sub>O의 비율을 변화 시켜 가며, <sup>1</sup>H-NMR에서 얻은 각각의 적분 비. 적분 비를 통하여 ap : p 비를 구한 결과.

### 2.3.3 피로저항성

SO<sub>3</sub>-BPDBTEO가 열린 상태와 평형상태인 PSS를 왔다 갔다 하는 실험으로 PSS를 만들 때는 UV lamp의 365nm의 광원을 5cm의 거리에서 3분동안 쬔어 주었으며, 열린 상태의 경우 직접 제작한 blue LED의 광원을 5cm의 거리에서 12분 동안 쬔어 주었다. **Figure2.27, 2.28** 과 같이 50번째의 주기에서 초기 발광 세기의 85%까지 감소 하는 것을 확인 하였고, 20번째 까지는 94%로 거의 변함이 없이 안정하게 유지 된다는 것을 확인 하였다.

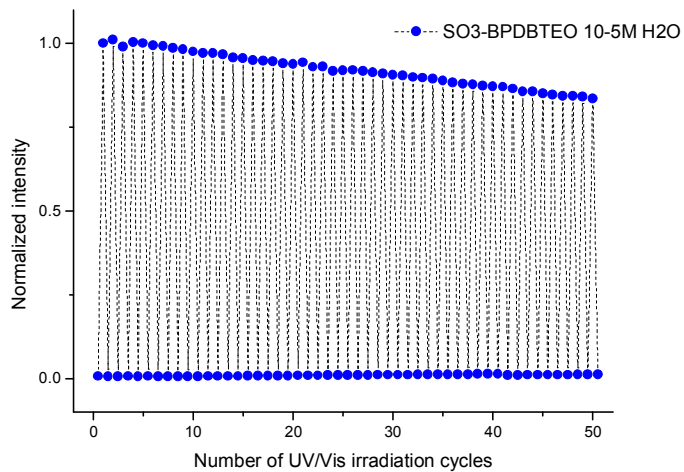


Figure 2.27 SO3-BPDBTEO 10<sup>-5</sup>M 수용액 상에서 얻은 50회 주기의 안정성 실험.

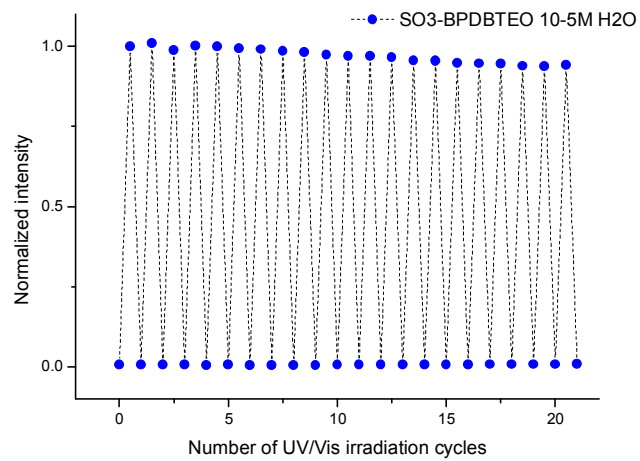


Figure 2.28 SO3-BPDBTEO 10<sup>-5</sup>M 수용액 상에서 얻은 20회 주기의 안정성 실험.

### 2.3.3 pH 실험

보고된 물질인 카르복실산이 달린 유도체의 경우 높은 발광수율을 가지고, 수용성 특징을 가졌다. 하지만 카르복실산의 상대적으로 높은 pKa 때문에 낮은 pH에서는 뭉치는 현상이 일어난다. 이로 인해 형광 및 용해도가 떨어지며 좁은 pH에서의 제한된 활용성을 가진다.<sup>3(b)</sup> 하지만 디자인한 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 경우 술폰산 유도체가 달려 있으며, 이는 카르복실산의 pKa 인 4.76보다 약 백만 배 큰 값인 -2.8의 pKa 를 가지고 있다. pH 에 대한 안정성 실험을 하기 위해 KCl 100 mmol 수용액에 염산과 수산화나트륨을 통하여 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10의 값을 맞춘 후 10<sup>-5</sup> M 농도에서 진행하였다. x축은 pH 이고, y축은 중성의 상대발광수율을 기준으로 하여 각각의 pH 들을 표준화 시킨 값들이다. **Figure2.29** 에서 보듯이 넓은 pKa 에서 뭉치거나 형광이 떨어지는 현상이 없다는 장점이 있다.

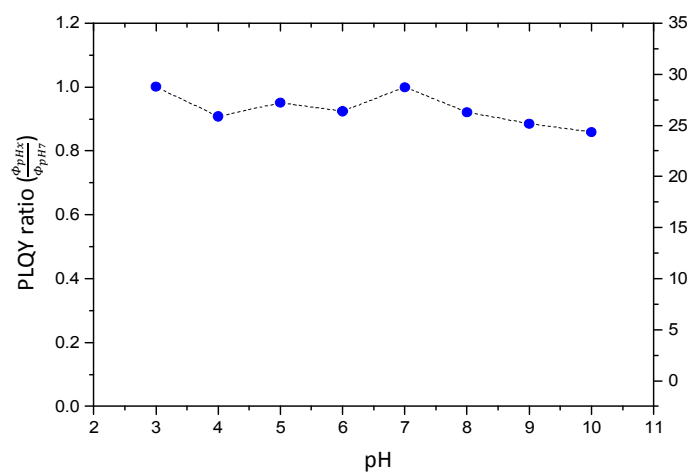


Figure 2.29 SO3-BPDBTEO  $10^{-5}M$  수용액 상에서 KCl 100mmol 완충 용액을 이용하여 pH 3~10에서의 안정성 실험.

## 2.4 결론

본 연구에서는 기존에 보고된 고휘광 수용성 디아릴에텐의 단점을 해결하고자 술폰산염을 도입한 분자를 개발하였다. 수용액상에서 강한 노랑색 형광( $\phi_F = 0.45$ ,  $\lambda_{em} = 540$  nm)을 나타내며, 빠른 cyclization quantum yield와 느린 cycloreversion quantum yield, 높은 피로저항성, 넓은 pH 범위, 높은 흡수계수를 가진다. 이를 통해 보고된 수용성 디아릴에텐의 단점을 해결하고, 바이오 이미징에 사용하기에 이상적인 광변색 물질이라는 것을 알 수 있었다. 나아가 초고해상도 현미경에 가능성을 보여주는 물질이라고 생각된다. 이외에도 물과 메탄올에서의 광 물리적 특성을 비교하여 응집현상 효과가 거의 없다는 것을 알 수 있었다. 또한 물과 메탄올에서의 광변색성 특성을 비교하여 물에서는 cyclization이 느리게 일어나고, cycloreversion이 빠르게 일어나는 것을 분석하였다.

## 2.5 참고문헌

1. (a) “Photochromic molecule” : M. Irie, C. C. Yamada, JP2012172139; (b) BenotRoubinet ,Mariano L. Bossi,Philipp Alt, Marcel Leutenegger,Heydar Shojaei, Sebastian Schnorrenberg,Shamil Nizamov, Masahiro Irie, Vladimir N. Belov,and Stefan W. Hell, Angew.Chem. Int. Ed. 2016, 55,15429 –15433.
2. Michinori Takeshita, Nobuo Kato, Susumu Kawauchi, Tatsuya Imase, Junji Watanabe, and Masahiro Irie, J. Org. Chem. 1998, 63, 9306–9313
3. Kakishi Uno, Hiroyuki Niikura, Masakazu Morimoto, Yukihide Ishibashi, Hiroshi Miyasaka, and Masahiro Irie, J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 13558–13564
4. Yamaguchi, T.; Irie, M. J. Photochem. Photobiol., A 2006, 178, 162.
5. Tuyoshi Fukaminato, Takashi Hirose, Takao Doi, Masaki Hazama, Kenji Matsuda, and Masahiro Irie, J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 17145–17154
6. (a)M. Irie, T. Lifka, S. Kobatake, N. Kato, J. Am. Chem. Soc.



- 2000, 122, 4871 – 4876.; (b) A. Mejiritski, A. Y. Polykarpov, A. M. Sarker, D. C. Neckers, J. Photochem. Photobiol. A 1997, 108, 289 – 293.; (c) K. Kasatania, S. Kambea, M. Irie, J. Photochem. Photobiol. A 1999, 122, 11 – 15.
7. Uchida, K.; Tsuchida, E.; Aoi, Y.; Nakamura, S.; Irie, M. Chem. Lett. 1999, 63.

## Chapter 3. 고휘광 디아릴에텐을 이용한 바이오 이미징

### 3.1 서론

광변색성 물질군중 가장 우수한 열적 안정성과 피로저항성을 가진 디아릴에텐의 경우, 바이오 이미징과 초고해상도 이미징등 다양한 분야에서 우수한 광변색 물질로 여겨지고 있다.<sup>1</sup> 하지만 기존의 디아릴에텐의 경우는 형광이 꺼지는 방식으로 광변색 물질과 형광체를 연결하거나 섞은 후 에너지 전달을 이용하는 방식을 이용해왔는데, 이는 이미징 분야에서 **Figure3.1** 과 같이 형광이 꺼지는 것보다 낮은 명암대비를 갖는다는 단점을 가지고 있다.<sup>2</sup> 이러한 단점이 해결된 디아릴에텐은 광변색 현상과 동시에 형광이 꺼지는 물질이다.<sup>3</sup> 하지만 이를 생체 내에서 활용하기에는 물에 녹지 않는다는 단점 때문에 한계를 가지고 있었다. 이를 해결하기 위해 나노입자를 활용하여 생체 내에서 활용하였지만, 나노입자는 오스트발트 숙성 현상에 의해 나노입자가 뭉치게 되고 생체 내에서 독성을 가질 수 있게 된다. 이외에도 분자단위로 이미지를 얻을 수 없다는 점과 단 분자와 다르게 상대적으로 큰 크기와 무게로 보다 작은 세포의 움직임을 추적하기 어렵다는 단점이 있다.<sup>4</sup> 이를 해결하기 위해 형광이 꺼지는

디아릴에텐의 연구를 바탕으로<sup>5</sup> 단당류와 카르복실산을 수용성 문제를 해결하였지만, 순수한 물이 아닌 메탄올과 물의 혼합 수용액과 넓은 pH 범위에서 작동하지 못한다는 단점으로 인해 여전히 한계점을 가지고 있다.<sup>6</sup> 이러한 수용성 문제를 해결하기 위해 작은 pKa 값을 가진 술폰산염을 도입 하였고<sup>5h</sup>, 우수한 열적 안정성과 피로저항성, 높은 흡수 계수와 발광수율, 빠른 고리화 반응과 느린 역 반응으로 이미지를 하기 위한 이상적인 광변색 물질 군을 개발하였다. 이러한 물질 군이 세포 내에 흡수되는지 확인하고, 세포 내에서의 광변색성 특성을 분석하여 바이오 이미징에 적합한 물질인지를 확인하고자 한다. 이러한 특징은 초고해상도 현미경에 이용하기 위한 조건과 유사하다<sup>7</sup>. 초고해상도 현미경인 RESOLFT(reversible saturable optical linear fluorescence transitions)를 이용하여 기초적인 실험을 하였다. 첫번째로 세포내의 광변색 물질을 가지고 pump-probe 실험을 하였다. 이는 몇초만에 꺼지고 켜지는지 조건을 잡는 실험으로, 초고해상도 현미경이 적용 가능 한다는 것을 확인 하였다. 두번째로 전기적 결합을 이용한 라벨링이다. 회절한계 이하의 세포구조 및 세포의 움직임을 분석하기 위해선 광변색성 물질을 항체에 붙인 후 세포에 라벨링 하여야 한다. **Figure3.2** 와 같이 라벨링은 광변색 물질을 항체에 붙인 후 항원 항체 반응을 이용하여 특정 항원에 결합하는 것으로, 이를 통해 세포의 구체적인 구조를 확인 할 수 있게 한다. **Figure3.3** 와 같이 항체에

연결하는 방법은 크게 공유결합으로 연결하는 방법과 전기적 상호작용으로 연결하는 방법이 있다.<sup>8</sup> 공유결합의 경우 결합이 안정하다는 장점이 있지만, 세포활성에 영향을 끼칠 수 있으며, 합성적으로 최적화 하는 것이 어려우며, 세포마다 다른 방법을 적용하여야 해서 보편적으로 사용하기에는 한계가 있다.<sup>9</sup> 또한 전기적 결합의 경우 결합이 불안정하다는 단점이 있지만, 합성적으로 간단하며 모든 세포에 범용적으로 쓸 수 있는 방법이다.<sup>10</sup> 초고해상도현미경을 통하여 다양한 종류의 세포를 분석하기에는 전기적 결합을 이용하는 것이 유리하다. 새로 개발된 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO의 경우 수용성 특성이외에도 술포산염을 가지고 있어 음전하를 띄므로, 전기적으로 양전하를 가진 입자 또는 세포와 결합을 할 수 있다. 전기적 결합이 유효한지 확인하고, 이를 통해 초고해상도 현미경에도 적용가능한 광변색 물질이라는 것을 보이하고자 한다.

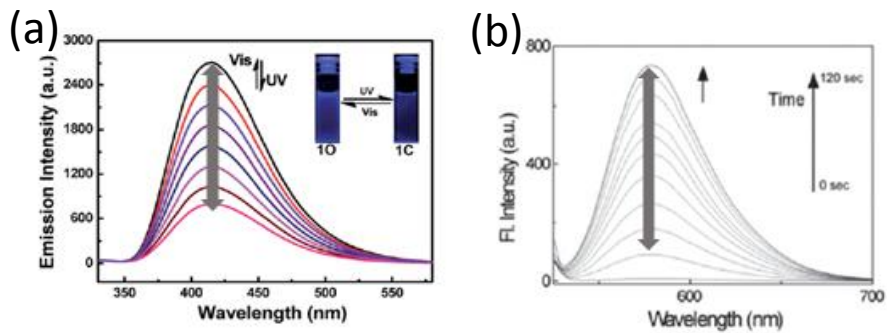


Figure 3.1 (a)형광이 꺼지는 디아릴에텐의 발광 스펙트럼, (b)형광이 켜지는 디아릴에텐의 발광 스펙트럼<sup>2</sup>

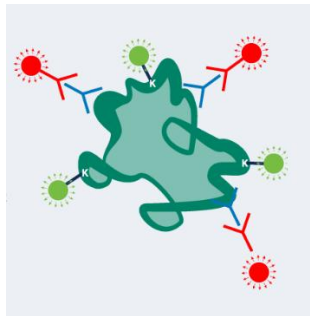


Figure 3.2 항체에 연결된 형광체가 항원/항체 반응으로 세포에 라벨링 되는 모식도

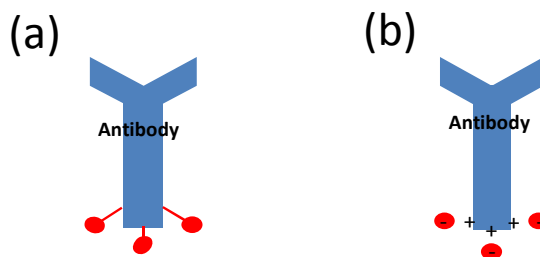


Figure 3.3 항체에 연결하기 위한 2가지 방법. (a) 공유결합 (b) 전기적 결합

## 3.2 실험

### 3.2.1 세포준비

세포준비에 사용한 시약은 sigma-aldrich, 세진시아이, alfa aesar 등의 업체를 통해 구매하고 별도의 정제 없이 사용하였다. 세포준비는 보고된 논문을 참고 하였으며<sup>11</sup>, 사용한 세포는 Hela cell으로 사람의 자궁경부암 조직에서 얻어낸 세포계이다. 공초점현미경에서 이미지를 바로 얻기 위해 콘포칼 디쉬에 Hela cell을 푼다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 10%의 FBS가 첨가된 배지를 콘포칼 디쉬에 넣는다. 이후 37° C와 5%의 이산화탄소의 환경을 만든 후, 5일 동안 배양한다. 배양 후 배지를 제거한다. PBS와 SO3-BPDBTEO 10<sup>-3</sup>M 수용액을 1:1의 부피 비로 혼합한 후 세포에 1시간 30분 동안 흡수 시킨다. 흡수되지 않은 광변색성 물질을 제거 하기 위해 PBS로 수 차례 씻어준다. 이후 파라포름알데하이드로 세포를 고정시키고 이미징 배지로 사용하기 위해 PBS를 넣는다.

### 3.2.2 양전하 나노입자 형성

나노입자 형성에 사용한 시약은 sigma-aldrich, 세진시아이, alfa aesar 등의 업체를 통해 구매하고 별도의 정제 없이 사용하였다. 사용한 나노입자는 합성한 나노입자와 상업적으로 구매한 나노입자 2 개이다. 합성한 나노입자의 경우 F-127 계면 활성제를 5 ml 의 3 차 증류수에 10 mg/ml 로 녹인다. 이후 poly styrene(PS) 25 mg 을 1 ml 의 toluene 에 녹인다. 계면활성제가 녹아있는 수용액에 PS 용액 20 ul 를 떨어 뜨린다. 이후 20 분동안 음파처리를 한 후 가열하여 소량의 toluene 을 날린다. 이러한 과정을 총 5 번 반복하여 최종 적으로 5 ml 의 3 차증류수에 F-127 은 10 mg/ml, Ps 는 500 ug/ml 가 되도록 한다. 이후 양전하를 가지는 poly ethyleneimine(PEI, branched, Mn : 1300)을 10 ug/ml 첨가 하여 PS 나노입자를 둘러 싸게 한다. 상업적으로 구매한 나노입자는 실리카 나노입자로 표면에 아민이 처리 되어 있어, 수용액 상에서 양전하를 가지고 있다.

### 3.2.3 전기적 결합

양전하를 가지는 2 가지의 나노입자를 음전하 특성을 가지는 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 에 전기적으로 붙이고자 하였다. 이를 위해 양전하를 가지는 나노입자 수용액 50 ul 과 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-3</sup> M 수용액 50 ul 을 물 9.9 ml 에 넣고 30 분 가량 교반 시켰다. 이후 원심 분리를 통하여 결합하지 않은 광변색성 물질을 제거 하였다.



### 3.2.4 공초점현미경

사용된 공초점 현미경은 초고해상도 현미경인 STED가 부착된 현미경으로 모델명은 SP8X로 leica 제품과 자체 제작한 현미경 2가지를 사용하였다. 바이오이미징의 경우 SP8X를 사용하였고, 발광 스펙트럼의 범위를 지정하기 위해 Alexa488을 참고 물질로 잡고 499 nm~610 nm의 영역을 scan하였다. 형광을 켜기 위해서 UV lamp의 365 nm 광원을 샘플로부터 5 cm의 거리에서 2분 동안 쬔어 주었고, 형광을 끄는 것은 458 nm의 argon laser를 100%의 세기로 5분간 쬔어 주었다. 형광 이미지는 488 nm의 argon laser를 2%의 세기로 쬔어 주어 얻었다. 또한 저 배율의 이미지는 10배 대물렌즈를 사용하였고, 고 배율의 이미지는 63배 대물렌즈를 사용하였다. 각각은 소프트웨어로 2배 확대하여 이미지를 얻었다.

나노입자 실험에 사용된 현미경은 자체 제작한 현미경으로 나노입자에 전기적으로 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 를 붙인 후 UV lamp 의 365 nm 광원을 사용하여 쬔 후 현미경으로 측정하였다.

### 3.2.5 pump-probe 실험

세포 내에 흡수된 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO가 몇 초 만에 꺼지고 꺼지는지를 확인 하는 pump-probe 실험을 하였다. Pump-probe 실험은 초고해상도 실험을 하기 전 몇 초 단위로 이미지를 얻어야 하는지 정하는 기초 실험이다. 사용된 초고해상도 현미경은 자체 제작한 RESOLFT (reversible saturable optical linear fluorescence transitions) 으로 형광을 키는 광원은 375 nm, 형광을 끄고 읽어 드리는 광원은 488 nm를 사용하였다. 우선 형광을 켜는 광원으로 광변색성 물질을 켜는데 걸리는 시간을 확인 한후, 형광을 끄는 광원을 이용하여 꺼지는데 걸리는 시간을 측정한다. 이러한 실험을 여러 주기 동안 반복하여, 조건을 정하게 된다.

### 3.3 결과 및 논의

#### 3.3.1 세포 흡수

PBS와 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-3</sup>M 수용액을 1:1의 부피 비로 혼합한 후 Hela cell에 2시간 동안 흡수 시킨다. 흡수되지 않은 광변색성 물질을 제거 하기 위해 PBS로 수 차례 씻어준다. 이후 파라포름알데하이드로 세포를 고정시키고 이미징 배지로 사용하기 위해 PBS를 넣는다. 세포에 형광체가 흡수되었는지 확인하기 위해 공초점 현미경을 사용하여 확인하였다. **Figure3.4, 3.5** 과 같이 형광 이미지와 DIC 이미지를 확인한 결과, SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 처리 하지 않은 Hela cell의 경우는 형광을 보이지 않았지만, SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 처리한 Hela cell의 경우는 형광을 보이는 것을 알 수 있었다. 그리고 10배 대물렌즈를 사용한 이미지를 통하여 모든 세포에 흡수가 잘되었다는 것을 확인하였고, **Figure3.6** 과 같이 63배 대물렌즈를 사용한 이미지를 통하여 세포 내에 균일하게 흡수 되었다는 것을 확인하였다.

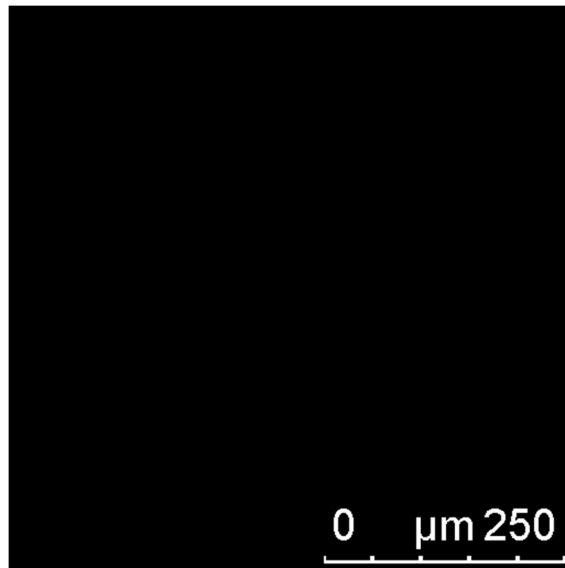
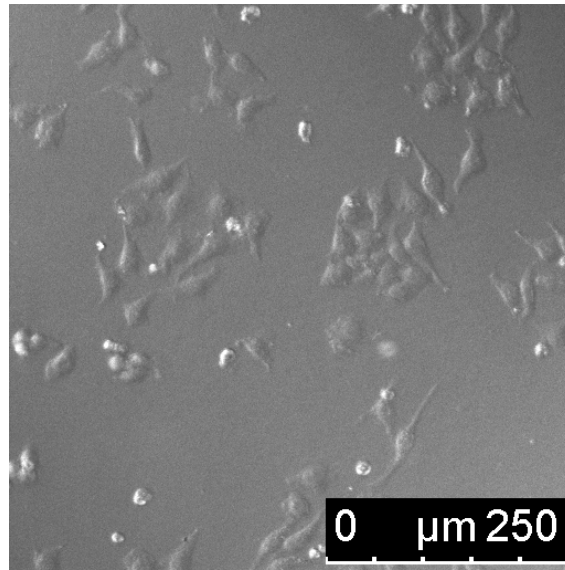


Figure 3.4 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 흡수 하지 않은 Hela cell의 공초점 현미경 사진. 488 nm 광원을 사용. (10배 대물렌즈 이미지)

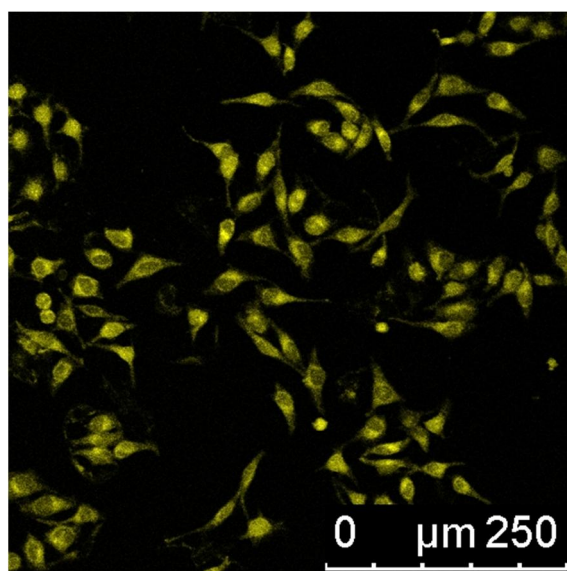
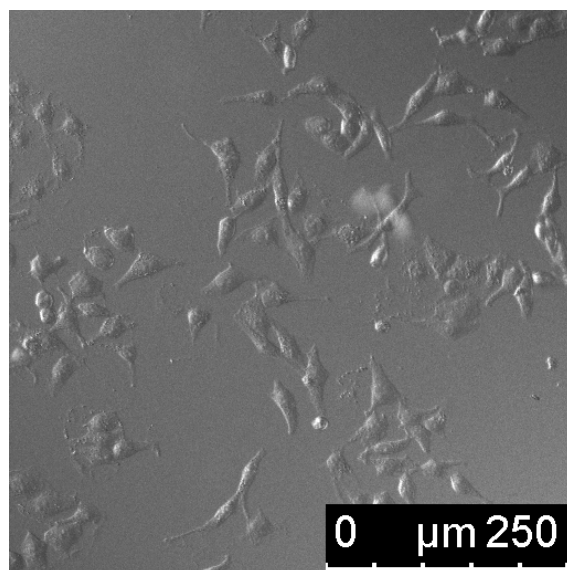


Figure 3.5 SO3-BPDBTEO을 흡수 한 HeLa cell의 공초점 현미경 사진. 488 nm 광원을 사용. (10배 대물렌즈 이미지)

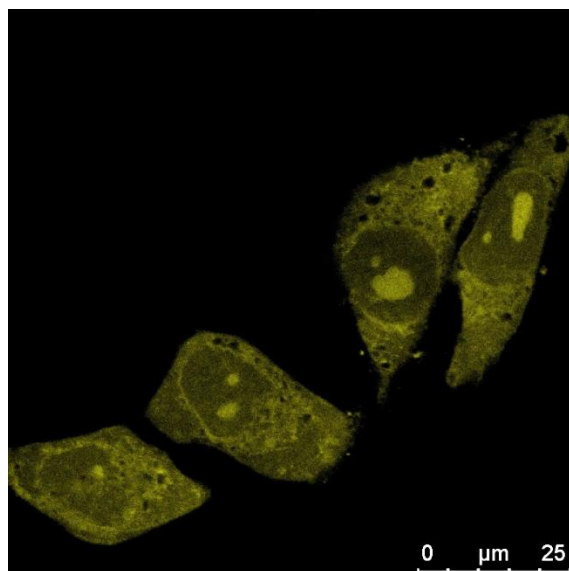
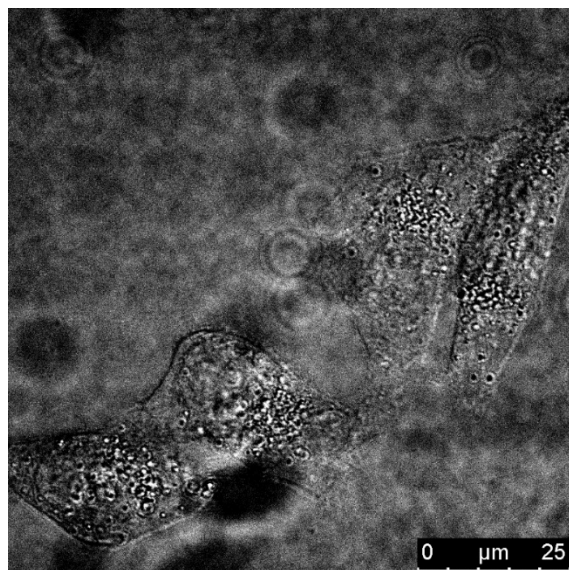
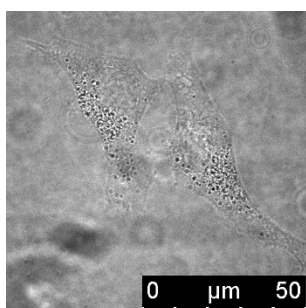
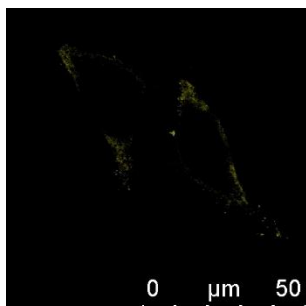


Figure 3.6 SO3-BPDBTEO을 흡수 한 HeLa cell의 공초점 현미경 사진. 488 nm 광원을 사용.(63배 대물렌즈 이미지)

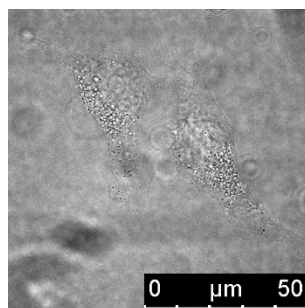
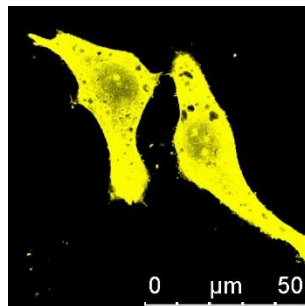
### 3.3.2 세포 내 광변색성 실험

세포 내에 흡수된 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO가 세포 내에서 광변색성 현상이 안정적으로 일어나는지 확인 하였다. 발광 스펙트럼의 범위를 지정하기 위해 Alexa488을 참고 물질로 잡고 499 nm~610 nm의 영역을 scan하였다. 형광을 켜기 위해서 UV lamp의 365 nm 광원을 샘플로부터 5 cm의 거리에서 2분 동안 쬔어 주었고, 형광을 끄는 것은 458 nm의 argon laser를 100%의 세기로 5분간 쬔어 주었다. 형광 이미지는 488 nm의 argon laser를 2%의 세기로 쬔어 주어 얻었다. 형광을 켜고 끄는 과정을 반복한 후 공초점현미경 내의 소프트웨어를 통해 이미지 내 광자의 총량을 계산하여 수치화 하였다. **Figure3.7** 와 같이 세포 내에서 4회의 주기 동안 안정적으로 형광이 꺼졌다 켜지는 것을 확인할 수 있었고, **Figure3.8** 과 같이 그래프를 그려 세포내에서 형광이 유지 되는 것을 확인 할 수 있었다.

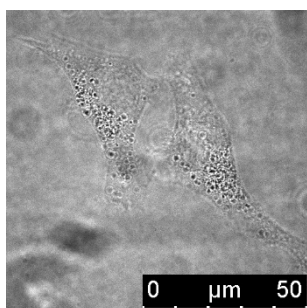
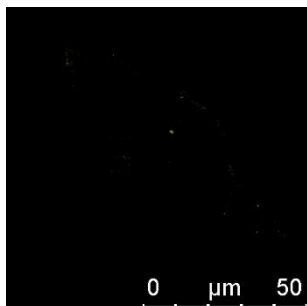
(a) Off: 458



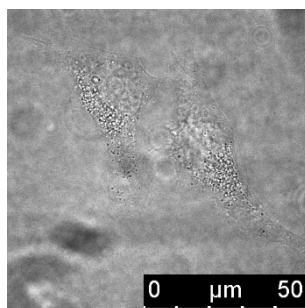
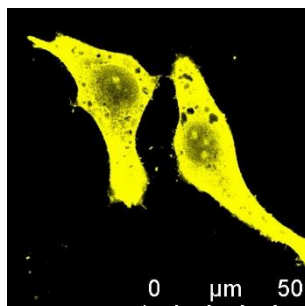
(b) ON:



(c) Off: 458 nm<sub>2</sub>

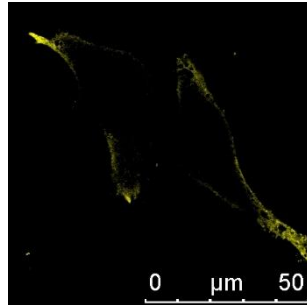


(d) ON: 365nm<sub>2</sub>

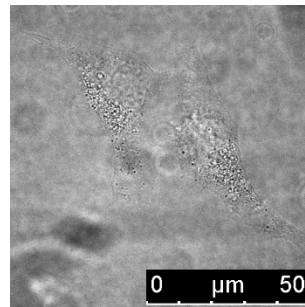
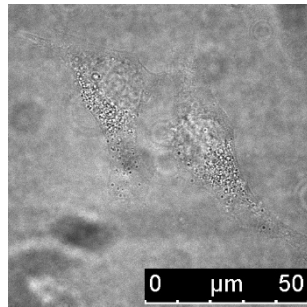
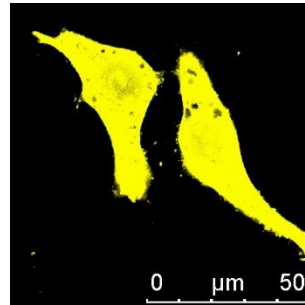




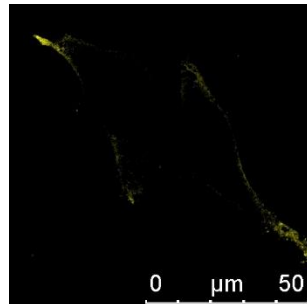
(e) Off: 458 nm\_3



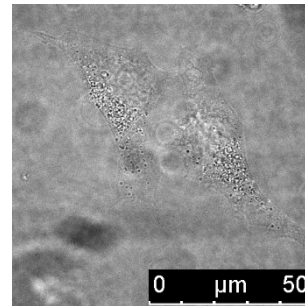
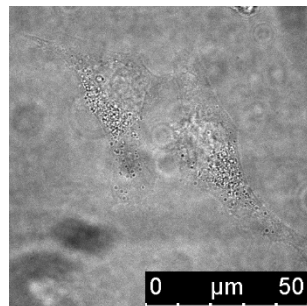
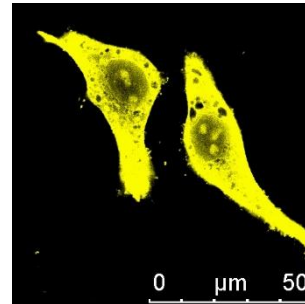
(f) ON: 365nm\_3



(g) Off: 458 nm\_4



(h) ON: 365nm\_4



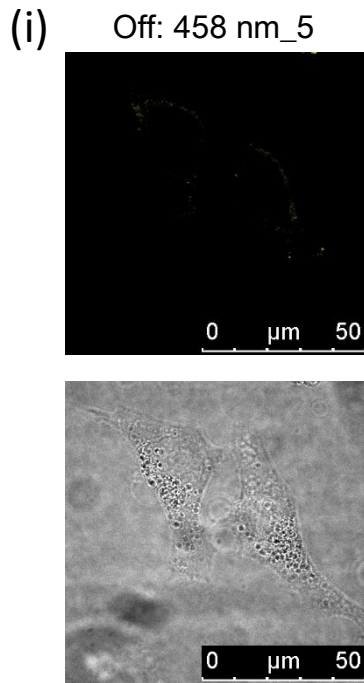


Figure 3.7 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO를 흡수 한 Hela cell의 공초점 현미경 사진으로 세포 내에서의 광변색성 현상을 488 nm 광원을 이용하여 형광으로 확인. (a)형광이 꺼진 초기 시작점, (b) 365 nm 3분, (c) 458 nm 5분, (d) 365 nm 3분, (e) 458 nm 5분, (f) 365 nm 3분, (g) 458 nm 5분, (h) 365 nm 3분, (i) 458 nm 5분.(63배 대물렌즈 이미지)

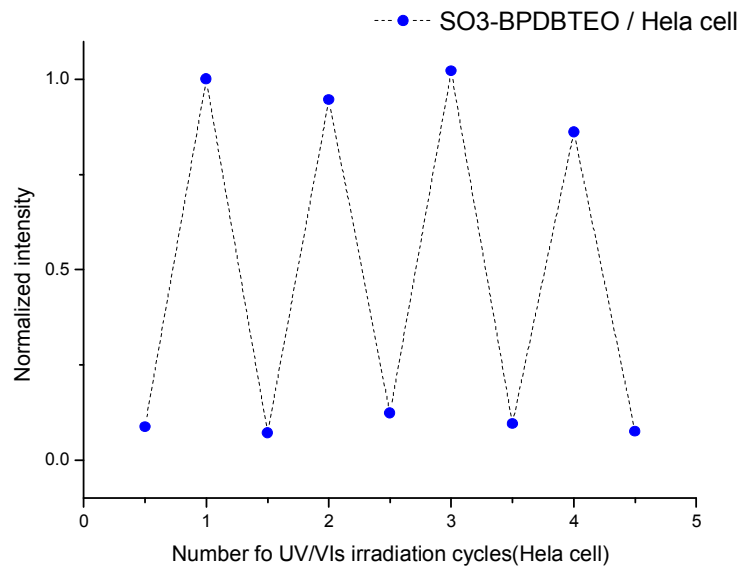


Figure 3.8 SO3-BPDBTEO을 흡수 한 Hela cell에서 얻은 이미지에서 각각의 광자의 총량을 계산하여, 4회의 주기 동안 안정적으로 형광이 나오는 것을 확인.

### 3.3.3 pump-probe 실험

사용된 초고해상도 현미경은 자체 제작한 RESOLFT(reversible saturable optical linear fluorescence transitions)으로 형광을 키는 광원은 375 nm, 형광을 끄고 읽어 드리는 광원은 488 nm를 사용하였다. 공초점현미경을 통하여 세포 내에서 안정적으로 형광이 켜지고, 꺼지는 것을 확인하였지만, 실제적으로 초고해상도 현미경에 사용하기 위해선 도넛모양의 광원을 이용하여 아주 좁은 지역에서 몇 초만에 꺼지고, 켜지는지에 대한 pump-probe 실험이 필요로 된다. **Figure3.9, 3.10** 와 같이 375 nm의 광원을 사용 하여 형광을 켜는데 걸리는 시간은 20 us이며, 488 nm의 광원을 사용 하여 형광을 끄는데 걸리는 시간은 40 ms이다. **Figure3.11** 과 같이 총 5회의 주기를 반복한 결과 동일한 시간에 안정적으로 켜지고 꺼지는 것을 확인하였다. 이를 통해 SO3-BPDBTEO는 바이오 이미징 뿐 아니라 초고해상도 현미경에도 적합한 광변색성 물질이라는 것을 알 수 있었다.

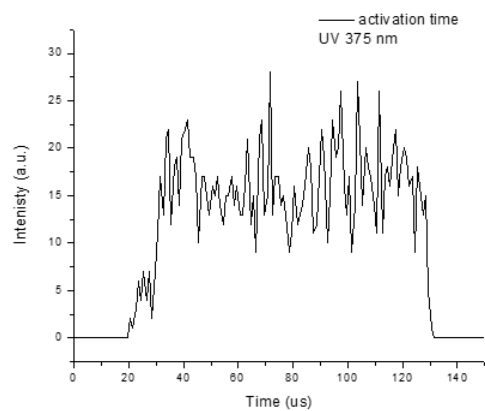


Figure 3.9 Hela cell 내부의 SO3-BPDBTEO pump-probe 실험 결과. 375 nm광원을 사용하여 형광을 켜는데 걸린 시간 20 us

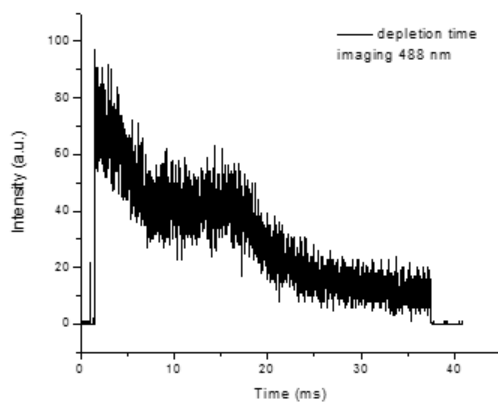


Figure 3.10 Hela cell 내부의 SO3-BPDBTEO pump-probe 실험 결과. 488 nm광원을 사용하여 형광을 끄는데 걸린 시간 40 ms

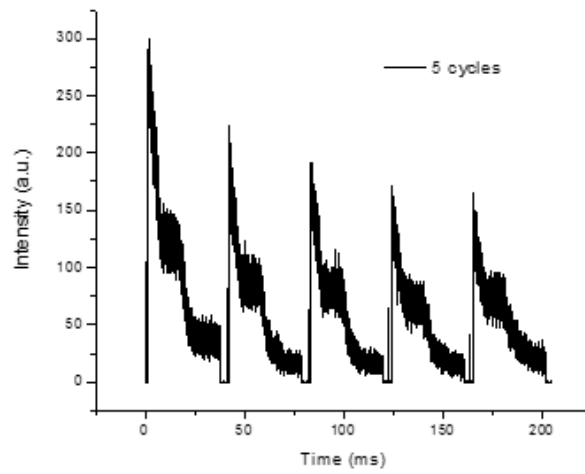


Figure 3.11 Hela cell 내부의 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO pump-probe 실험 결과. 5회의 주기를 반복한 결과.

### 3.3.4 나노입자 형성 확인

사용한 나노입자는 합성한 나노입자와 상업적으로 구매한 나노입자 2개이다. 합성한 나노입자의 경우 F-127 계면 활성제를 5ml 의 3차 증류수에 10 mg/ml로 녹인다. 이후 poly styrene(PS) 25 mg을 1 ml의 toluene에 녹인다. 계면활성제가 녹아있는 수용액에 PS 용액 20 ul를 떨어 뜨린다. 이후 20분동안 음파처리를 한 후 가열하여 소량의 toluene을 날린다. 이러한 과정을 총 5번 반복하여 최종 적으로 5 ml의 3차 증류수에 F-127은 10 mg/ml, Ps는 500 ug/ml가 되도록 한다. 이후 양전하를 가지는 poly ethyleneimine(PEI, branched, Mn :1300)을 10 ug/ml첨가 하여 PS 나노입자를 둘러 싸게 한다. 상업적으로 구매한 나노입자는 실리카 나노입자로 표면에 아민이 처리 되어 있어, 수용액 상에서 양전하를 가지고 있다. 이때 형성된 나노 입자의 경우 **Figure3.12, 3.13** 와 같이 나노입자 분석기를 이용하여 PS 나노 입자의 경우 314 nm, 실리카 나노입자의 경우 32 nm를 나타내는 것을 확인하였다.

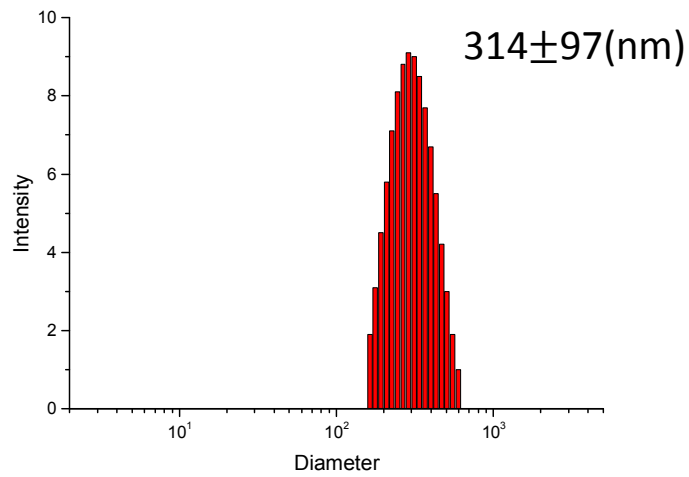


Figure 3.12 PS/F-127/PEI를 사용한 나노입자의 크기 분포 그래프.  
( $314 \text{ nm} \pm 97 \text{ nm}$ )

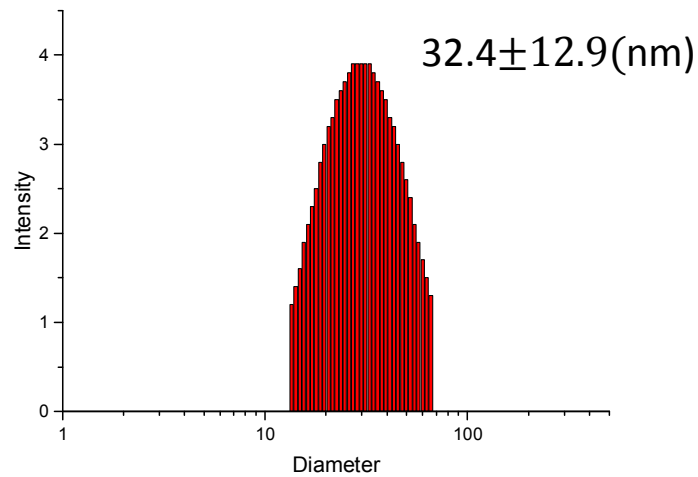


Figure 3.13 상업적으로 구매한 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 나노입자의 크기 분포  
그래프. ( $32.4 \text{ nm} \pm 12.9 \text{ nm}$ )



### 3.3.5 전기적 결합 확인

양전하를 가지는 2 가지의 나노입자(PS: 314 nm, Silica: 32 nm)를 음전하 특성을 가지는 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 에 전기적으로 붙이고자 하였다. 이를 위해 양전하를 가지는 나노입자 수용액 50 ul 과 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO 10<sup>-3</sup> M 수용액 50 ul 을 물 9.9 ml 에 넣고 30 분 가량 교반 시켰다. 이후 원심 분리를 통하여 결합하지 않은 광변색성 물질을 제거 하였다. 이후 현미경으로 찍기 위해 슬라이드 유리 위에 Poly-L-Lysine 수용액(0.1% w/v)을 떨어뜨린 후 살짝 건조시키고 물로 씻어낸다. 그런 다음 흡착된 나노입자 수용액을 떨어 뜨린 후 30 분정도 가라앉을 때까지 기다린다. 붙었는지 확인 하기 위해 UV lamp 의 365 nm 의 광원을 사용하여 형광을 켜 후, 자체 제작한 공초점 현미경을 통하여 형광을 확인 하였다. 다음의 **Figur3.14, 3.15** 과 같이 형광이 나오는 것을 확인하였다. 형광이 나오는 나노입자의 크기를 반치폭을 통하여 확인 시 **Figur3.16, 3.17** 와 같이 각각 315 nm 와 250 nm 를 가지는 것을 확인 하였다. PS 나노입자의 경우 나노입자 분석기를 이용한 값과 비슷한 결과를 얻었지만, 실리카 나노입자의 경우 큰 차이를 보이고 있다. 이는 렌즈 기반 현미경이 가지는 회절한계 때문이다. 아래의 수식에 따라 488 nm 의 광원을 통하여 형광을 확인 하였기 때문에, 약 250 nm 정도의 회절 한계를 가지게 된다.

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (\lambda = \text{파장}, n = \text{굴절률}, \theta = \text{입사각}, d = \text{광로차})$$

회절 한계인 250 nm와 **Figure3.17** 에서 보듯이 반치폭에서의 실리카 나노입자의 크기가 서로 비슷한 것을 알 수 있었다. 만약 초고해상도 현미경을 사용한다면, 원래 크기에 가까운 크기를 볼 수 있을 것으로 예상 된다. 이를 통해 전기적 결합이 유효하다는 것을 확인하였고, 앞서 생체 내에서 형광을 켜고 끄는 것이 가능한 것을 보아 전기적인 라벨링 방법을 통하여 향후 초고해상도 현미경을 사용 할 수 있을 것으로 보인다. 또한 이를 통해 보다 작은 세포의 구조와 움직임을 확인 할 수 있는 이상적인 광변색 물질이라는 것을 예상 할 수 있었다.

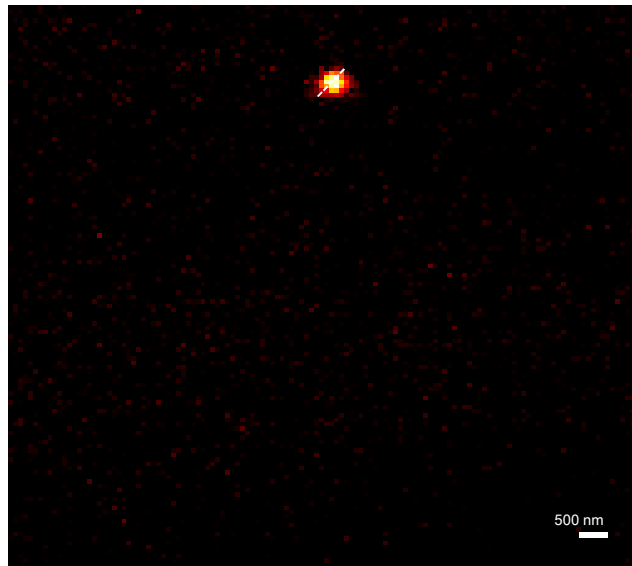


Figure 3.14 PS/F-127/PEI를 사용한 나노입자의 공초점 현미경 이미지.(광원은 488 nm를 사용)

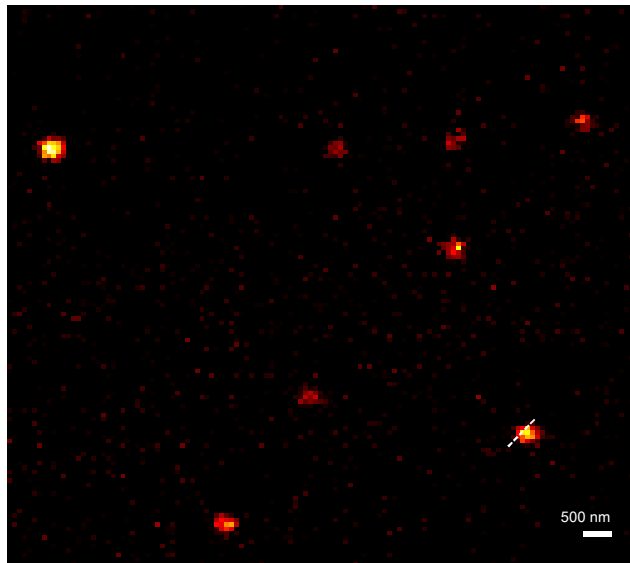


Figure 3.15 상업적으로 구매한  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  나노입자의 공초점 현미경 이미지. (광원은 488 nm를 사용)

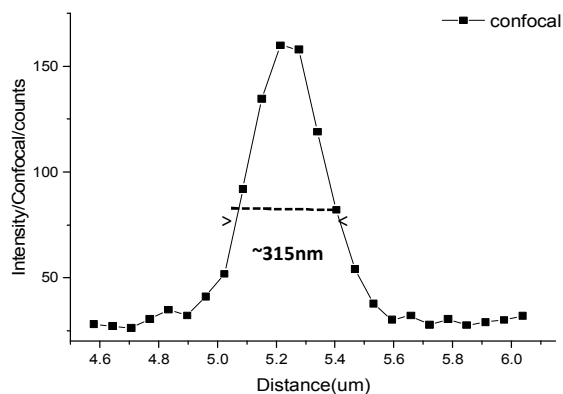


Figure 3.16 PS/F-127/PEI를 사용한 나노입자의 공초점 현미경을 통한 입자 크기 계산 결과. 315 nm의 크기 도출 (광원은 488 nm를 사용)

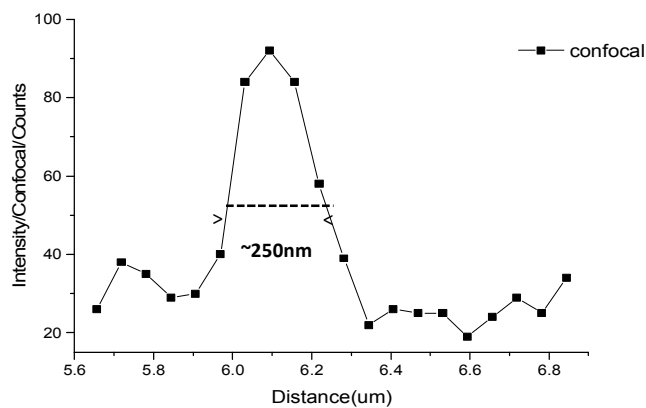


Figure 3.17 상업적으로 구매한 SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> 나노입자의 공초점 현미경을 통한 입자 크기 계산 결과. 315 nm의 크기 도출 (광원은 488 nm를 사용)

### 3.4 결론

본 연구에서는 우수한 특성을 가진 SO<sub>3</sub>-BPDBTEO가 세포에 흡수 및 바이오 이미징이 가능 한지 확인하였고, 그 결과 세포 내에 흡수가 잘되며 광변색성 현상이 잘 유지되는 것을 확인하였다. 나아가 이러한 특징들이 초고해상도 현미경에 필요한 조건임을 확인하고 그에 필요한 기초 실험을 진행하였다. 기초적인 실험으로써 Pump-probe 실험과 전기적 라벨링을 진행하였고, 각각의 가능성을 확인 하였다. 일련의 결과들을 통하여 바이오 이미징에 적합한 광변색 물질이란 것을 확인 함과 동시에 초고해상도 현미경에 적용 가능성 또한 제시하였다.

### 3.5 참고문헌

1. (a) Masahiro Irie, Tuyoshi Fukaminato, Takatoshi Sasaki, Naoto Tamai & Tsuyoshi Kawai, *Nature*, 420, 759 (2002); (b) Masahiro Irie, *Chem. Rev.*, 100, 1685 (2000); (c) Masahiro Irie, Tuyoshi Fukaminato, Kenji Matsuda, and Seiya Kobatake, *J. Mater. Chem. C*, 2016,4, 3075–3093; (d) Shou-Zhi Pu, Qi Sun, Cong-Bin Fan, Ren-Jie Wang and Gang Liu, *J. Mater. Chem. C*, 2016,4, 3075–3093
2. (a) Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Wolf Lindwasser, O.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. *Science* 2006, 313, 1642.; (b) Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. *Biophys. J.* 2006, 91, 4258.; (c) Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. *Nat. Methods* 2006, 3, 793.; (d) Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Boyarskiy, V. P.; Jakobs, S.; Hell, S. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2010, 49, 3520.
3. Kakishi Uno, Hiroyuki Niikura, Masakazu Morimoto, Yukihide Ishibashi, Hiroshi Miyasaka, and Masahiro Irie, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 13558–13564

4. (a) H. Kobayashi, P. L. Choyke, *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 83 – 90; (b) R. Weissleder, C.-H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov, Jr., *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 375 – 378.
5. (a) Ying Zou, Tao Yi, Shuzhang Xiao, Fuyou Li, Chunyan Li, Xia Gao, Junchen Wu, Mengxiao Yu, and Chunhui Huang, *J. AM. CHEM. SOC.* 2008, 130, 15750–15751; (b) Shouzhi Pu, Hongliang Liu, Gang Liu, Bing Chen, Zhipeng Tong, *Tetrahedron* 70 (2014) 852–858; (c) Nobuaki Soh, Kenji Yoshida, Hizuru Nakajima, Koji Nakano, Toshihiko Imato, Tuyoshi Fukaminato, and Masahiro Irie, *Chem. Commun.*, 2007, 5206–5208; (d) Xuyang Yao, Teng Li, Sheng Wang, Xiang Ma and He Tiana, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 7166–7168; (e) Svetlana M. Polyakova, Vladimir N. Belov, Mariano L. Bossi, and Stefan W. Hell, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3301–3312; (f) Yueyuan Mao, Keyin Liu, Guanglei Lv, Ying Wen, Xingjun Zhu, Haichuang Lan and Tao Yi, *Chem. Commun.*, 2015, 51, 6667–6670; (g) Rui Li, Cerize S. Santos, Tyler B. Norsten, Kentaro Morimitsu and Cornelia Bohne, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 1941–1943; (h) Michinori Takeshita, Nobuo Kato, Susumu Kawauchi, Tatsuya Imase,

- Junji Watanabe, and Masahiro Irie, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9306–9313
6. (a) “Photochromic molecule” : M. Irie, C. C. Yamada, JP2012172139; (b) BenotRoubinet ,Mariano L. Bossi,Philipp Alt, Marcel Leutenegger,Heydar Shojaei, Sebastian Schnorrenberg,Shamil Nizamov, Masahiro Irie, Vladimir N. Belov,and Stefan W. Hell, *Angew.Chem. Int. Ed.* 2016, 55,15429 –15433.
7. (a) Thomas A. Klar, Stefan Jakobs, Marcus Dyba, Alexander Egner, and Stefan W. Hell, Klar, 2000, PNAS, 97, 8206–8210.; (b) Stefan W. Hell and Jan Wichmann, OPTICS LETTERS,Vol. 19, No. 11, June 1, 1994.; (c) Michael J Rust, Mark Bates, Xiaowei Zhuang, NATURE METHODS, VOL.3 NO.10, OCTOBER 2006.; (d) Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott–Schwartz, Harald F. Hess, *Science* 15 Sep 2006, 313, 5793, 1642–1645.
8. (a) John Goodchild, Bioconjugate Chem., 1990, 1, 3, 165–187.; (b) Jyoti K Jaiswal, Ellen R Goldman, Hedi Mattoussi,



- Sanford M Simon, *Nature Methods*, 1, 73 – 78, 2004.; (c) Jyoti K. Jaiswal, Hedi Mattoussi, J. Matthew Mauro, and Sanford M. Simon<sup>1</sup>, *Nature Biotechnology* 21, 47 – 51 (2002).; (d) Binil Itty Ipe, Anuj Shukla, Huachang Lu, Bo Zou, Heinz Rehage, And Christof M. Niemeyer, *ChemPhysChem* 2006, 7, 1112 – 1118
9. (a) T. H. Ha, J. Y. Jeong, B. H. Chung, *Chem. Commun.* 2005, 3959.; (b) R. Hong, T. Emrick, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 13 572.
  10. T. Jin, F. Fujii, H. Sakata, M. Tamura, M. Kinjo, *Chem. Commun.* 2005, 4300.
  11. Ilseung Yang, Jong Woo Lee, Sunjin Hwang, Jung Eun Lee, Eunhak Lima, June Lee, Doyk Hwang, Clara H. Kimd, Young Sam Keum , Seong Keun Kim, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 166 (2017) 52–57

## **Abstract**

# **Studies on Synthesis and Characterization of Highly Fluorescent Water-Soluble Turn-on Diarylethene for Bio-imaging**

Sang Hoon Um

Department of Materials Science and Engineering

The Graduate School

Seoul National University

Stimuli-responsive materials are attracting attention as they gain importance in various fields such as biosensors, drug delivery, and smart optical systems. Among them, light is considered as the best stimulus. The reason is accessibility, fast reactivity, lack of physical contact, and easy focus on narrow areas. These advantages are favorable in understanding and tracking the structure and movement of cells in vivo, and furthermore, the use of photochromic materials in bio imaging is rapidly increasing due to the emergence of super resolution microscopes. This is

because, if fluorescent is turned on and off differently from conventional fluorophore, fluorescence of the fluorescent material can be distinguished from the auto fluorescence of the cell to obtain images having a high contrast ratio. Among various photochromic materials, diarylethene has the best fatigue stability and thermal stability. In addition, the forward reaction by light stimuli is fast, the reverse reaction is slow, so that the information can be rapidly read by the light, and the state can be maintained stably while reading the information. However, conventional diarylethene have been used in systems where fluorescent is turned off by energy transfer by connecting or mixing with fluorophore. This has a disadvantage that it has a lower contrast ratio than a system in which a fluorescent is turned on. This problem has been solved by the turn-on diarylethene, but it still has its limitations due to the disadvantage that it is difficult to dissolve in water. Although nanoparticles have been used to solve these water insoluble disadvantages, nanoparticles can aggregate particles due to Ostwald ripening and become toxic in vivo. It is also difficult to track small cell movements with relatively large size and weight, unlike single molecules. In addition, there is a

disadvantage in that a cell structure image smaller than a nanoparticle cannot be obtained. Due to these reasons, development of water soluble turn-on diarylethene is required. Based on the study of Turn-off diarylethene, an example using monosaccharide and carboxylic acid to make turn-on water soluble diarylethene has been reported. However, due to its insolubility in pure water and its relatively high pKa value, it has a disadvantage of having a narrow pH range and low solubility in water. In addition to being ideal bio imaging photochromic dye as a single molecule, it is expected to show great potential in the field of super resolution microscopy beyond the diffraction limit of 200 nm.

**In Chapter 2**, I developed a water soluble turn-on diarylethene. The newly synthesized water soluble diarylethene has a wide range of pH values and high water solubility unlike the previously reported water soluble diarylethenes. Also, high contrast ratio images can be stably obtained due to high absorption coefficient and photo luminescence quantum yield, high fatigue resistance, fast cyclization reaction and slow cycloreversion. As a result, it was realized that it could be used as an excellent photochromic

material in cells.

In Chapter 3, HeLa cells were incubated and water soluble diarylethenes were absorbed into HeLa cells. Confocal microscopy confirmed that the newly synthesized photochromic material was absorbed into the cells and the fluorescence was stably turned off and on. A pump–probe experiment was carried out in HeLa cells to determine if this material works on a super resolution microscopy. In practice, labeling is required for use in super resolution microscopes. The photochromic material was attached to the nanoparticles with positive charge by electrical coupling. Confocal microscopy confirmed that the electrical coupling was effective and showed that it is a promising material for bio imaging and super resolution images in the future.

**Keyword: water soluble, photochromism, diarylethene, bio imaging, turn on fluorescence, super resolution microscopy.**

**Student Number: 2015-20842**